

ELCE CRISTINA CÔRTEZ REBOUÇAS

**ALCOOLISMO E COMPORTAMENTO ALIMENTAR**  
**ESTUDO NEUROPATOLÓGICO E NEUROQUÍMICO**  
**NO NÚCLEO ARQUEADO DO RATO**

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Neurociências apresentada à  
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Porto, 2016

Artigo 48º, parágrafo 3 – A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto – Decreto 19 337, de 29 de Janeiro de 1931).

Os trabalhos experimentais que integram esta dissertação foram realizados no Centro de Morfologia Experimental, sediado no Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. A candidata realizou o trabalho experimental com o apoio de uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/66941/2009) atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

**Orientadora:** Professora Doutora Susana Isabel Ferreira da Silva de Sá  
(Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto).



A candidata declara que teve contribuição determinante na realização do trabalho experimental (execução dos protocolos e elaboração técnica), interpretação dos resultados e discussão dos mesmos. Além disso, contribuiu ativamente para a redação dos trabalhos apresentados.



## **Corpo Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto**

### **Professores Efetivos (Por antiguidade)**

Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões

Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira

Doutor José Agostinho Marques Lopes

Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares Silva

Doutor Alberto Manuel Barros da Silva

Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante

Doutor José Henrique Dias Pinto de Barros

Doutora Maria de Fátima Machado Henriques Carneiro

Doutora Isabel Maria Amorim Pereira Ramos

Doutora Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira

Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira

Doutor Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira

Doutor Rui Manuel Almeida Mota Cardoso

Doutor José Carlos Neves das Cunha Areias

Doutor Manuel Jesus Falcão Pestana Vasconcelos

Doutor João Francisco Montenegro Andrade Lima Bernardes

Doutora Maria Leonor Martins Soares David

Doutor Rui Manuel Lopes Nunes

Doutor José Eduardo Torres Eckenroth Guimarães

Doutor Francisco Fernandes Rocha Gonçalves

Doutor José Manuel Pereira Dias de Castro Lopes

Doutor António Albino Coelho Marques Abrantes Teixeira

Doutor Joaquim Adelino Correia Ferreira Leite Moreira

Doutora Raquel Ângela Silva Soares Lino.

## **Professores Jubilados ou Aposentados**

Doutor Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto

Doutor Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar

Doutor António Augusto Lopes Vaz

Doutor António Carlos de Freitas Ribeiro Saraiva

Doutor António Carvalho Almeida Coimbra

Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga

Doutor António José Pacheco Palha

Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira

Doutor Belmiro dos Santos Patrício

Doutor Cândido Alves Hipólito Reis

Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão

Doutor Cassiano Pena de Abreu e Lima

Doutor Daniel Filipe de Lima Moura

Doutor Daniel Santos Pinto Serrão

Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira

Doutor Fernando Tavares Veloso

Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Menezes

Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares

Doutor José Carvalho de Oliveira

Doutor José Fernando Barros Castro Correia

Doutor José Luís Medina Vieira

Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães

Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra

Doutor Luís Alberto Martins Gomes de Almeida

Doutor Manuel António Caldeira Pais Clemente

Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira

Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes

Doutor Manuel Maria Paula Barbosa

Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães

Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo

Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga

Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães

Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso

Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

**Nomeação do Júri da Prova de Doutoramento de**

**- ELCE CRISTINA CORTÊS REBOUÇAS -**

**Programa Doutoral em Neurociências – Ramo Neurociências Experimentais**

Nos termos do disposto do n.º 2 do art.º 18.º do Regulamento dos Terceiros Ciclos de Estudos da Universidade do Porto, a seguir se publicita o júri de doutoramento em Neurociências – Ramo Neurociências Experimentais, da mestre Elce Cristina Cortês Rebouças, nomeado por despacho vice-reitoral de 06 de fevereiro de 2017, com a tese “Alcoolismo e Comportamento Alimentar Estudo Neuropatológico e Neuroquímico no Núcleo Arquado do Rato”:

**Presidente:** Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira, professora catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**VOGAIS:** Doutor Norberto Cysne Coimbra, professor associado da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo;

Doutor José Carlos Márcia Andrade, professor associado do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Instituto Universitário de Ciências da Saúde;

Doutor José Paulo Alves Vieira de Andrade, professor associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;

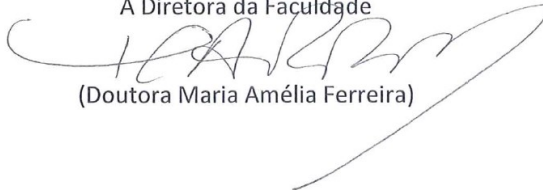
Doutor Armando Cardoso, professor auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;

Doutora Susana Isabel Ferreira da Silva de Sá, professora auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e orientadora da tese;

Doutora Ana Manuela Onofre Meireles, investigadora auxiliar do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Serviço Académico, 09 de fevereiro de 2017.

A Diretora da Faculdade



(Doutora Maria Amélia Ferreira)

À Professora Doutora Susana Sá.

Aos Lago Teixeira,  
Nanda, Inês e Pedro,  
inesquecíveis.

À Gisela Maia,  
pela amizade.

Aos meus filhos,  
Alícia e Elisinho,  
Norte e Sul.

Ao Acil,  
por tudo.

Aos meus irmãos,  
Júnior, Teté e Cecinha,  
partilhamos mais que genes,  
partilhamos memórias,  
partilhamos histórias.

Aos meus sobrinhos,  
Maria Luísa, Murilo, Rebecca, Arthur e Lorena,  
alegria e continuação.

Aos meus pais,  
Nice e Elízio  
que me ensinaram a importância  
das asas e das raízes.



## **Outro abraço...**

Procuro por ti em toda parte

A porta que abre

És sempre tu a chegar

Escuto teus passos

Antecipo teu sorriso maroto

Novamente o vazio

Não voltarás

O teu lugar na cama

A tua cadeira preferida

Sempre ocupados

Por onde andarás? Andas?

Sobre o mistério da vida

Eu não sei nada

Outro abraço teu?

Talvez ...

Eu anseio...

A dor da saudade

Sufoca, exaspera, enlouquece

Estranhamente, a calma, a doçura

A procura acaba

Estás aqui, pai

Em mim!

## **AGRADECIMENTOS**

Todo empreendimento demanda o envolvimento e o esforço de muitos, com contribuições diferentes, mas que concorrem para o mesmo objetivo. Dito isto, depois deste longo período dedicado ao Programa Doutoral em Neurociências (PDN), não poderia deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos e o meu apreço por todos os que tiveram um papel nesta trajetória, nas suas mais diversas formas e nas diferentes etapas.

Manifesto a minha respeitosa homenagem aos animais sacrificados durante este trabalho, esperando que os resultados obtidos possam trazer alguma contribuição para a ciência de forma que estes sacrifícios não tenham sido em vão.

Manifesto os meus primeiros agradecimentos à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), que possibilitou, por meio da liberação das minhas atividades profissionais, a realização deste percurso.

Expresso os meus agradecimentos ao Professor Doutor Manuel Maria Paula-Barbosa, à Professora Doutora Deolinda Lima e, com especial deferência à Professora Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira. Na realização de suas diferentes e importantes funções, reuniram as necessárias condições para que este trabalho fosse realizado.

Dirijo os meus maiores agradecimentos à Professora Doutora Susana Sá, orientadora desta dissertação. Reconheço a sua competência e dedicação para que este trabalho fosse

levado a bom termo. A Professora Doutora Susana Sá tornou-se orientadora nas etapas finais deste trabalho, assim pude tê-la inicialmente como colega, sempre solícita e generosa foi constante durante a execução de todas as diferentes etapas do trabalho que permitiram a realização desta dissertação. Agradeço-lhe os ensinamentos e a disponibilidade, mestre no manuseio adequado e respeitoso dos animais e na execução precisa de cirurgias, muito contribuiu para a realização dos experimentos e para o processamento e a análise do material. Orientadora incansável e dedicada na correção dos artigos científicos. A elaboração desta dissertação somente foi possível graças à sua indiscutível colaboração e forte empenho, motivo pelo qual estou e estarei sempre grata.

À Professora Doutora Lenira Coelho, ao Professor Doutor Ubirajara Cairo e ao Professor Doutor Renato Figueiredo, que no exercício da função de diretores do Departamento de Ciências Naturais (DCN), diligenciaram tudo o que se fez necessário e adequado para viabilizar a conclusão deste doutoramento, manifesto meus respeitosos agradecimentos.

À Professora Doutora Alexilda Oliveira de Souza, Pró-Reitora de Pós-graduação da UESB, agradeço por toda orientação e apoio manifestados que tiveram muita importância para a conclusão deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Anatomia da FMUP, Professor Doutor Armando Cardoso, Professor Doutor Pedro Pereira, Professora Doutora Susana Silva e a Professora Doutora Sandra Leal, agradeço as colaborações e os ensinamentos das técnicas utilizadas em

especial aos métodos de estereologia e as técnicas de imunohistoquímica, bases deste trabalho.

Ao Professor Doutor Nikolay Lukoyanov e ao Professor Doutor Paulo Andrade, pelos quais tenho elevada estima, expresso a minha gratidão pela solicitude que lhes caracteriza, em especial ao Professor Nikolay Lukoyanova pelos seus ensinamentos de estatística.

À Dr.<sup>a</sup> Elena Lukoyanova, por quem eu tenho grande estima e consideração, agradeço o apoio prestado nos trabalhos laboratoriais. Agradeço sua atenção e as manifestações de amizade.

Aos Professores da área de Biologia Geral do DCN expresso meus agradecimentos por todo apoio durante o período que estive afastada para a realização deste trabalho, que tão solidariamente assumiram as disciplina que leciono.

Quero ainda prestar o meu reconhecimento à Sr.<sup>a</sup> Cristina Fonseca pelo apoio e ajuda na lida com os animais.

À Dr.<sup>a</sup> Andreia Bessa, ao Dr. Nélson Lopes, à Dr.<sup>a</sup> Alexandra, ao Sr. Alberto Alfaia e à Dr.<sup>a</sup> Ana Tavares expresso meus agradecimentos por todo apoio e colaboração.

À Sr.<sup>a</sup> Ana por toda atenção e carinho, expresso meus agradecimentos e sinceros votos que a vida lhe aponte bons e calmos caminhos, bem os merece.

Aos secretários do DCN Dr. Bruno Reis, Dr. Saló Judson, Dr.<sup>a</sup> Juliana Neves, Dr. Adriano Calixto e à Dr.<sup>a</sup> Wadna Nolasco agradeço toda solicitude e disponibilidade no exercício de suas funções.

Ao Professor Doutor Henrique Almeida reconheço toda atenção e ajuda prestada.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia manifesto o meu reconhecimento pela Bolsa de Doutorado concedida.

À Nanda, à Inês e ao Pedro Teixeira manifesto minha profunda amizade e reconhecimento pelo acolhimento, pelo apoio e ajuda, pelos laços de família que estabelecemos. Têm papel importantíssimo em nossas vidas, sempre estarão connosco. É difícil imaginar como teriam sido estes anos se não tivéssemos a graça de os ter em nossas vidas.

Finalmente, expresso minha profunda gratidão aos amigos, que muito contribuíram quer direta, quer indiretamente para que este projeto fosse concluído. Amigos dos dois lados do Atlântico aos quais peço licença para tratar pelos primeiros nomes, obrigada pelo apoio, pelo carinho, pela motivação, pelo ambiente acolhedor que criaram, por estarem ao meu lado

nesta trajetória: Edinaldo Medeiros, Adriano Maia, Carlos Lourenço, Teresa Miranda, Maria João Marques, Patrícia Lima, Pierre Lima, Sandra Mara, Antônio Sérgio, Andréia Sanches, Simone Guimarães, Angélica Tasso, Djalma Rezende, Aldair Oliveira, Márcia Menezes, Ritoca, Angelina e Maria Pereira. Vossas manifestações de carinho e amizade foram fundamentais. A todos meu profundo obrigada.

Quero testemunhar o meu reconhecimento por toda ajuda e todo apoio e expressar os meus profundos agradecimentos à Dr.<sup>a</sup> Gisela Maia, colega do PDN e amiga sempre presente.

A todos os familiares e amigos da família, em especial à tia Lita, à tia Lourdes, à Nara, à Rita, à Sr.<sup>a</sup> Iraci, à Sr.<sup>a</sup> Ieda, ao Sr. Elizeo e à Sr.<sup>a</sup> Aracélia deixo os meus sinceros agradecimentos por todo vosso apoio e pela motivação que transmitiram.

À minha família agradeço por tudo, que não consigo expressar com palavras, mas que estou certa, compreendem o significado. Estiveram comigo, apesar da distância, em todos os momentos e foram os pilares que me mantiveram firme e confiante. Peço desculpas pela minha ausência de vossas vidas, por estar longe em momentos que tanto precisaram de mim. Aos meus pais, expresso minha gratidão e o meu amor, aos meus irmãos e sobrinhos manifesto meu profundo carinho. Aos meus sogros, Carlinda e Manuel, meus sinceros agradecimento por todo apoio e cuidado. Aos meus cunhados Emílio e Sheylla agradeço o incentivo de sempre. A todos o meu mais profundo carinho e a minha grande gratidão.

Ao Elisinho expresso o meu amor, o meu agradecimento pela compreensão e o meu pedido desculpas pela ausência numa fase tão importante de sua vida. Mas, estivestes em meu coração e pensamento o tempo todo, filho.

À minha Alícia quero mais que manifestar o meu amor e agradecer pela alegria que é a sua existência, quero pedir desculpas. Em pró deste objetivo, deixei a desejar no mais importante e mais delicioso papel que a vida me deu: ser sua mãe. Carregamos as mesmas marcas, filha amada.

Por fim, ao Acil, que me acompanhou nesta trajetória, apoiando, ajudando, participando de perto de todas as etapas deste percurso, expresso meu carinho e agradecimento, sua parceria foi fundamental durante todo o processo.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ACTH** – hormona adrenocorticotrófica

**$\alpha$ -MSH** – hormona estimuladora de melanócitos-alfa

**AgRP** – peptídeo relacionado ao gene agouti

**ARN** – núcleo arqueado

**CART** – transcrito regulado pela cocaína e pela anfetamina

**CKK** – colecistocinina

**CLIP** – peptídeo do lobo intermediário da adeno-hipófise semelhante a corticotrofina

**CPE** – carboxipeptidase E

**DA** – dopamina

**D1 a D5** – recetores da dopamina

**DMN** – núcleo dorsomedial

**EB** – benzoato de estradiol

**ER $\alpha$**  – recetor de estrogénio alfa

**GLP-1** – peptídeo tipo glucagon 1

**GLU** – glucagon

**INS** – insulina

**L-DOPA** – L-3,4-dihidroxifenilalanina

**LEP** – leptina

**LH** – hipotálamo lateral

**LPH** – lipotrofina

**MC** – melanocortinas

**MCH** – hormona concentradora de melanina

**mRNA** – ácido ribonucleico mensageiro



**NAc** – núcleo accumbens

**N-POC** – fragmento N-terminal do POMC

**NPY** – neuropeptídeo Y

**NTS** – núcleo do trato solitário

**Ob-R** – recetores da leptina

**OCIT** – ocitocina

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OREX** – orexina

**OX1R e OX2R** – recetores da orexina

**PC1/3** – convertases de pró-hormona 1 e 3

**PC2** – convertases de pró-hormona 2

**PFA** – área perifornical

**PIB** – Produto Interno Bruto

**POMC** – pró-opiomelanocortina

**PP** – peptídeo pancreático

**PVN** – núcleo paraventricular

**PYY** – peptídeo YY

**RCD** – regulação de curta duração

**RLD** – regulação de longa duração

**SMTN** – somatostatina

**S ADIP** – sinais de adiposidade

**SNC** – sistema nervoso central

**S ORIX** – sinais orexigénios

**S SA** – sinais de saciedade

**TH** – tirosina hidroxilase

**TRH** – hormona libertadora da tirotrófina

**VMN** – núcleo ventromedial

**VTa** – área tegmental ventral

**Y1 - Y5** – recetores no NPY, do PP e do PYY

## ÍNDICE

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUÇÃO .....	5
1. Comportamento alimentar .....	7
2. Núcleo arqueado do hipotálamo .....	10
2.1 Mediadores do ARN envolvidos na ingestão de alimentos/gasto de energia .....	12
2.2 O núcleo arqueado no controlo do comportamento alimentar .....	19
3. Hormonas ovárias e comportamento alimentar .....	25
3.1 Estradiol .....	26
3.2 Ciclo éstrico .....	27
3.3 Recetor de estrogénio tipo alfa .....	28
4. Álcool .....	29
4.1 O etanol no comportamento alimentar .....	32
4.2 O etanol no sexo feminino .....	34
OBJETIVOS .....	36
Objetivo geral .....	37
Objetivos específicos .....	37
TRABALHOS CIENTÍFICOS .....	38
<i>Regulation of NPY and <math>\alpha</math>-MSH expression by estradiol in arcuate nucleus of Wistar female rats: a stereological study.</i> .....	39
<i>Changes in the female arcuate nucleus morphology and neurochemistry after chronic ethanol consumption and long-term withdrawal.</i> .....	49
DISCUSSÃO GERAL .....	61
CONCLUSÕES .....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Representação esquemática da homeostasia energética e da regulação do peso corporal. Baseado em Konturek e colaboradores (2005). ....	9
<b>FIGURA 2.</b> Modelo simplificado do processo de pós-tradução do POMC no hipotálamo. N-POC, fragmento N-terminal do POMC; JP, peptídeo de junção; ACTH, hormona adrenocorticotrófica; ACTH 1-17, de acetil do MSH; CLIP, peptídeo do lobo intermediário da adeno-hipófise semelhante a corticotrofina; LPH, lipotrofina; CPE, carboxipeptidase E; PC1/3, convertase de pró-hormona 1 e 3; PC2, convertase de pró-hormona 2. Baseado em Shimizu e colaboradores (2007) e Olney e colaboradores (2014b). ....	15
<b>FIGURA 3.</b> Representação esquemática das vias centrais envolvidas na regulação da ingestão de alimentos. ARN, núcleo arqueado; PVN, núcleo paraventricular; LH, hipotálamo lateral; PFA, área perifornical; NTS, núcleo do trato solitário; RLD, regulação de longa duração; RCD, regulação de curta duração; S SA, sinais de saciedade; S ORIX, sinais orexigénios; S ADIP, sinais de adiposidade; GRE, grelina; OREX, orexina; CKK, colecistocinina; PP, peptídeo pancreático; PYY, peptídeo YY; GLP-1, peptídeo tipo glucagon; GLU, glucagon; SMTN, somatostatina; LEP, leptina; INS, insulina; NPY, neuropeptídeo Y; AgRP, peptídeo relacionado ao gene agouti; $\alpha$ -MSH, hormona estimuladora de melanócitos-alfa; CART, transcrito regulado pela cocaína e pela anfetamina; CRH, hormona libertadora da corticotropina; OCIT, ocitocina; TRH, hormona libertadora da tirotrofina; MCH, hormona concentradora de melanina; #, peptídeos orexigénicos; *, peptídeos anorexigénicos. Baseado em Konturek e colaboradores (2005) e Valassi e colaboradores (2008). ....	24

**RESUMO**

O núcleo arqueado (ARN) é um núcleo hipotalâmico conhecido pelo seu papel na regulação do comportamento alimentar. A expressão proteica no ARN está relacionada com a modulação do comportamento alimentar, nomeadamente a expressão do neuropeptídeo Y (NPY), da hormona estimuladora dos melanócitos tipo alfa ( $\alpha$ -MSH), da enzima tirosina hidroxilase (TH) e de recetores de estrogénio tipo alfa ( $ER\alpha$ ). Os trabalhos elaborados no âmbito desta tese tiveram como objetivo avaliar os efeitos do estradiol e do consumo de álcool e da sua abstinência na estrutura e neuroquímica do ARN, em ratos fêmeas da estirpe Wistar com dois meses de idade.

A ação do estradiol no comportamento alimentar foi avaliada através da administração cíclica de estradiol a animais ovariectomizados. O efeito do etanol foi avaliado em ratos fêmeas cíclicas, submetidas a seis meses de consumo de álcool (20% v/v) ou após dois meses de abstinência. As variações ponderais nos animais e no consumo sólido foram determinadas em ambos os modelos, bem como o consumo de etanol no segundo modelo. Foram usados métodos estereológicos para estimar o volume e o número total de neurónios do ARN, assim como para estimar do número total de neurónios do ARN que expressam NPY,  $\alpha$ -MSH,  $ER\alpha$  e TH.

O estradiol parece influenciar o comportamento alimentar das fêmeas por intervir na regulação recíproca do NPY/ $\alpha$ -MSH no ARN. Com efeito, elevados níveis plasmáticos de estradiol induzem a diminuição da síntese de NPY e o aumento da síntese de  $\alpha$ -MSH, levando à diminuição da ingestão de alimentos e ao aumento do gasto energético. O etanol aporta calorias vazias que, quando ingeridas, desregulam os sinais orexigénios, reduzindo o consumo de alimento, levando à redução do peso corporal. A abstinência de etanol é suficiente para reverter este mecanismo, levando ao ganho de peso. O ARN mostrou-se mais resistente ao consumo de etanol do que à sua abstinência, uma vez que só a expressão do  $ER\alpha$  foi afetada por esta substância. A abstinência de etanol induz degeneração neuronal e perda de volume do ARN, afetando também a expressão do NPY. O etanol não causou grande variação na expressão proteica do ARN, o que sugere o envolvimento destes peptídeos noutros mecanismos, nomeadamente na resposta ao stresse, no qual a expressão do NPY e do  $ER\alpha$  no ARN possa ter um relevante papel.

Os trabalhos que compõem esta tese mostram que o estradiol e o etanol afetam a homeostasia energética e que, ao contrário do etanol, a sua abstinência causa transtornos estruturais e moleculares no ARN.

## **ABSTRACT**

The arcuate (ARN) is a hypothalamic nucleus known by its role in the regulation of the feeding behavior. The RNA express important neuropeptides associated with the modulation of the feeding behavior, namely the neuropeptide Y (NPY), the alpha-melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), dopamine and the estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ). The objective of the series of studies comprised in this thesis was the evaluation of the effects of estradiol and of alcohol consumption and its withdrawal in the structure and neurochemistry of the ARN of Wistar female rats with two months old.

The action of estradiol on feeding behavior was evaluated by the cyclical administration of estradiol to ovariectomized rats. The effect of ethanol was evaluated in female cyclic rats undergoing six months of ethanol consumption (20% v/v) or after two months of alcohol withdrawal. The body weight change of the animals and food consumption were assessed in both models, and the consumption of ethanol was assessed in the second model. The estimation of the volume and total number of neurons of the ARN, as well as the estimation of the total number of neurons expressing NPY,  $\alpha$ -MSH, ER $\alpha$  and TH in ARN were made by stereological methods.

Estradiol seems to affect the feeding behavior in the female by overriding the reciprocal regulation of the NPY/ $\alpha$ -MSH in the ARN. In fact, elevated plasmatic levels of estradiol promote the reduction of NPY synthesis and the increase in  $\alpha$ -MSH, decreasing food intake and increasing energy expenditure. Ethanol is an energy source of empty calories that when ingested, disturbs the orexigenic signals, reducing food consumption and body weight. Ethanol withdrawal was sufficient to reverse food intake, inducing weight gain. The ARN was more resistant to ethanol consumption than to its withdrawal, since only the expression of ER $\alpha$  was affected by this substance. The withdrawal of ethanol induced neuronal degeneration and loss of ARN volume and also affected the expression of NPY. Ethanol consumption did not induce almost changes in protein expression in the ARN, suggesting the involvement of these peptides in other mechanisms, particularly in stress responses, where NPY and ER $\alpha$  expression in the ARN may have a relevant role.

The studies that comprise this thesis show that the estradiol and ethanol affect energy homeostasis and, unlike ethanol, its withdrawal causes structural and molecular disorders in the ARN.



## **INTRODUÇÃO**

A homeostasia, ou seja, a manutenção do meio interno dentro de limites compatíveis com o funcionamento adequado dos diversos órgãos e sistemas, é crucial para a eficiência do organismo no meio ambiente (Machado e Haertel, 2014). Para a homeostasia contribuem vários componentes centrais e periféricos, sendo que o seu controlo é maioritariamente dependente do sistema nervoso central (SNC). Das várias áreas do SNC com papel de relevo no controlo da homeostasia destaca-se o hipotálamo (Machado e Haertel, 2014), porque é aí que estão localizados os centros de controlo da temperatura corporal, do balanço hidroeletrólítico, da pressão arterial e do comportamento alimentar. Uma das funções basilares para a homeostasia é o comportamento alimentar, dado que a capacidade para ajustar a ingestão alimentar como resposta a alterações das necessidades é uma característica essencial para a sobrevivência do organismo. Sabe-se ainda que, os desequilíbrios no comportamento alimentar estão associados a várias patologias, nomeadamente, a obesidade, a diabetes tipo II, doenças cardiovasculares e cancro (Konturek *et al.*, 2005). O controlo do comportamento alimentar envolve a integração de vários mediadores periféricos e centrais, tais como peptídeos, hormonas e neurotransmissores, provenientes do trato gastrointestinal, do tecido adiposo e de várias áreas do SNC (Valassi *et al.*, 2008). Os mediadores periféricos chegam ao SNC e desencadeiam a ativação dos mecanismos necessários para a manutenção das reservas energéticas dos organismos (Konturek *et al.*, 2005; Valassi *et al.*, 2008). Adicionalmente, existem outros fatores, externos e internos, capazes de alterar o equilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, nomeadamente a escassez de alimentos, o sedentarismo, o comprometimento do funcionamento de órgãos e sistemas, as hormonas, os fármacos ou mesmo drogas psicoativas. O estradiol, por exemplo, é uma hormona sexual que interfere no comportamento alimentar, por afetar mediadores envolvidos tanto na ingestão como no gasto energético e, a ausência desta hormona, como acontece na menopausa, está associada ao aumento de peso e a doenças cardíacas (MohanKumar *et al.*,

2011; Coyoy *et al.*, 2016; Kralova Lesna *et al.*, 2016). A utilização de substâncias psicoativas, como bebidas alcoólicas, parece também afetar a ingestão de alimentos. Os mecanismos subjacentes à ação destes compostos estão por clarificar. Daí que seja premente conhecer melhor os fatores que afetam o equilíbrio entre o consumo e o gasto energético, só assim é possível adotar as medidas preventivas adequadas de modo a evitar os desequilíbrios que possam comprometer a eficiente sobrevivência do indivíduo e, sobretudo, que possam levar ao desenvolvimento de patologias que acarretam grandes prejuízos para o indivíduo e também para a sociedade.

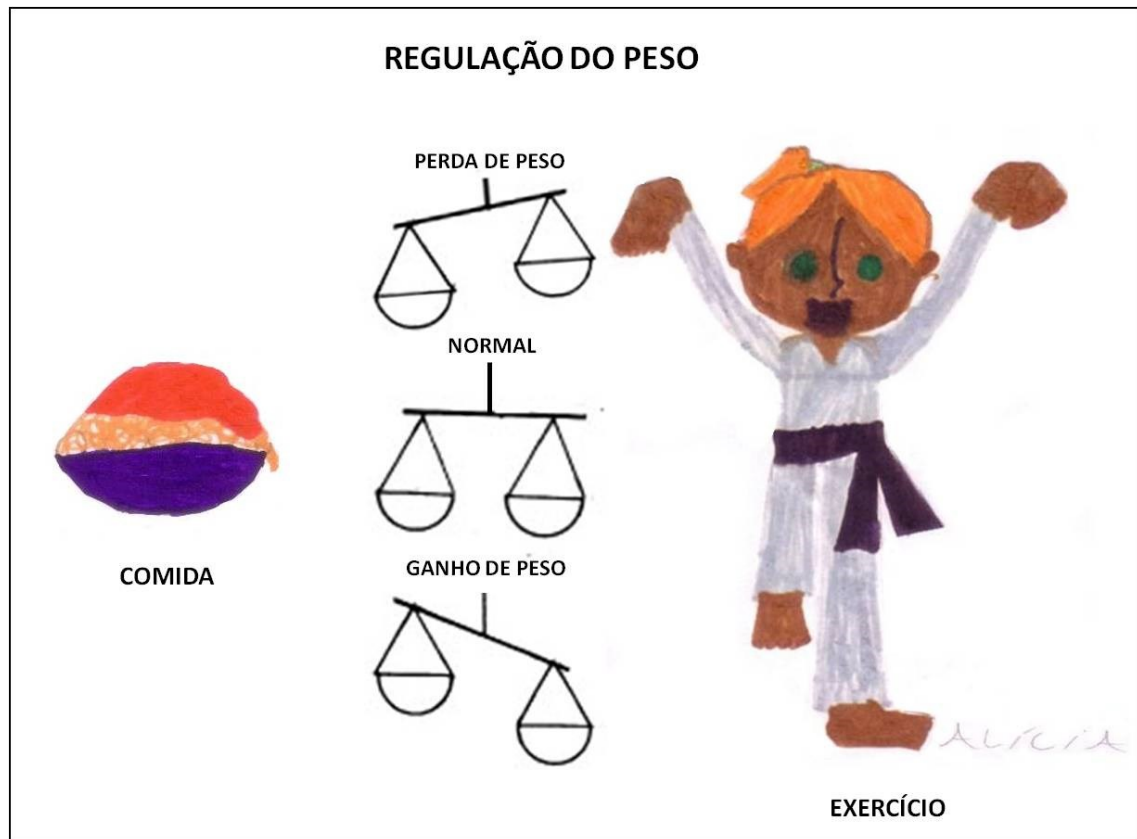
## **1. Comportamento alimentar**

A sobrevivência do organismo depende da ingestão de nutrientes e do eficiente metabolismo desses, nas proporções apropriadas para que as suas funções fisiológicas básicas sejam mantidas e as necessidades energéticas dos tecidos sejam atendidas (Jen *et al.*, 2010). A ingestão de alimentos e o gasto energético são regulados por mecanismos periféricos e centrais (Sandoval *et al.*, 2008) e estão sob a influência e interação de numerosos e complexos fatores fisiológicos, psicológicos, genéticos e ambientais (Bachmanov *et al.*, 2001; Minor *et al.*, 2009; Harrold *et al.*, 2012). No Homem, acrescem os fatores culturais, sociais e económicos, estes também com capacidade de modificar os hábitos alimentares. A sensação de prazer e de recompensa que se obtêm por consumir um dado alimento são sentimentos capazes de modular o comportamento alimentar e que podem contribuir para uma ingestão alimentar maior ou menor do que o necessário e, conseqüentemente, afetar o peso corporal do indivíduo (Harrold *et al.*, 2012). O comportamento alimentar é também influenciado pelo género do indivíduo; de facto, existe diferença na quantidade de alimentos ingeridos entre o género masculino e o feminino, sendo

que neste último crescem as variações ao longo do ciclo menstrual nas mulheres e do ciclo estrico nos animais (Asarian e Geary, 2006; Shi *et al.*, 2009; Asarian e Langhans, 2010; Dzenda *et al.*, 2013). A ingestão de alimentos é, assim, um comportamento complexo que envolve vários fatores e cujo desequilíbrio entre o que é consumido e a necessidade real de nutrientes do organismo implica alterações para o indivíduo, conduzindo quer à obesidade quer à desnutrição.

Os sinais mecânicos, metabólicos, endócrinos e neurais oriundos de órgãos da periferia do organismo, informam o SNC sobre o que foi ingerido, quanto foi ingerido e como foram metabolizados esses nutrientes. O SNC, por sua vez, integra essas informações e coordena o balanço entre a ingestão e o gasto energético (Sandoval *et al.*, 2008). A regulação do peso corporal é baseada na homeostasia energética, no entanto, a luta pela sobrevivência do indivíduo levou ao desenvolvimento de um grande número de mecanismos que promovem o ganho de peso e o armazenamento de gordura, tendo sido preterido o desenvolvimento de mecanismos que promovem a perda de peso (Druce *et al.*, 2004). Num balanço energético negativo, ou seja, quando o organismo está em déficit de reservas energéticas são desencadeados mecanismos que estimulam o apetite e o indivíduo é motivado a comer para fazer a reposição das suas reservas energéticas (Minor *et al.*, 2009). No entanto, num balanço energético positivo, os mecanismos envolvidos e que podem prevenir o excesso de peso não são tão eficientes e podem, facilmente, ser suplantados pelo estabelecimento de comportamentos contraditórios, como o sedentarismo e a ingestão excessiva de alimentos facilmente acessíveis. A diferença entre os mecanismos subjacentes ao gasto energético parece advir da adaptação dos organismos no sentido de suprir o fornecimento insuficiente de energia e não da necessidade de gastar calorias em excesso. Estas características parecem estar relacionadas com o facto de a desnutrição ser uma ameaça mais imediata para a sobrevivência da espécie do que o excesso de peso (Sainsbury e Zhang,

2010). No entanto, os mecanismos biológicos desenvolvidos no sentido de combater esta ameaça parecem estar diretamente relacionados com o aumento da obesidade observado nos últimos anos na espécie humana (Fig. 1).



**FIG. 1.** Representação esquemática da homeostasia energética e da regulação do peso corporal. Baseado em Konturek e colaboradores (2005).

Segundo Konturek e colaboradores (2005), há dois sistemas que participam na regulação da quantidade de alimento ingerido: a *regulação de curta duração* e a *regulação de longa duração*. A regulação de curta duração está relacionada com a prevenção da ingestão em excesso em cada refeição, enquanto a regulação de longa duração está associada com a manutenção de reservas de energia sob a forma de gordura. Diferentes sinais periféricos estão envolvidos nos dois sistemas de regulação da ingestão de energia, embora as áreas do SNC que participam destes mecanismos sejam as mesmas. O hipotálamo tem um papel preponderante na regulação do comportamento alimentar (Konturek *et al.*, 2005), no

entanto, outras regiões encefálicas estão também relacionadas com este comportamento, nomeadamente o núcleo do trato solitário (NTS), localizado no tronco encefálico. Esta área desempenha um papel importante no controlo da ingestão e do gasto energético, funcionando como entrada dos sinais neurais oriundos do trato gastrointestinal com destino ao hipotálamo. Também a amígdala, os núcleos da base, o córtex pré-frontal e a área postrema, estão relacionadas com distúrbios alimentares e com a regulação da reserva energética (Arora e Anubhuti, 2006; Valassi *et al.*, 2008).

## **2. Núcleo arqueado do hipotálamo**

O hipotálamo é considerado como a região chave do SNC no controlo da ingestão de alimentos e do gasto energético, estando alguns dos seus núcleos implicados nestas funções (Minor *et al.*, 2009). O hipotálamo é uma estrutura diencefálica, constituída principalmente por substância cinzenta, organizada em agregados celulares designados por núcleos. O fórnix divide-o numa região medial e outra lateral. A região medial, situada entre o fórnix e o III ventrículo, é rica em substância cinzenta e é aí que estão localizados os principais núcleos hipotalâmicos. A região lateral, situada lateralmente ao fórnix, apresenta um predomínio de fibras longitudinais (Simerly, 1995; Machado e Haertel, 2014). Simerly (1995) propôs a divisão do hipotálamo medial, por planos coronais, em quatro regiões: a pré-óptica, a anterior, a tuberal e a mamilar. A região pré-óptica compreende a área pré-óptica, a região anterior entre o quiasma óptico e a área dorsal adjacente até o sulco hipotalâmico, a região tuberal localizada entre o túber cinéreo e a área dorsal adjacente até o sulco hipotalâmico e por último, a região mamilar, entre os corpos mamilares e a área dorsal adjacente até o sulco hipotalâmico. No hipotálamo lateral (*lateral hypothalamus* – LH) está localizado o centro da fome e na região tuberal localiza-se o núcleo ventromedial (*ventromedial nucleus* –

VMN), conhecido como sendo o centro da saciedade (Elias *et al.*, 1998). O hipotálamo apresenta outros núcleos envolvidas na regulação do balanço energético, tais como o núcleo arqueado (*arcuate nucleus* – ARN) e o núcleo dorsomedial (*dorsomedial nucleus* – DMN), ambos situados na região tuberal, e o núcleo paraventricular (*paraventricular nucleus* – PVN) localizado na sua região anterior. Destes núcleos, o ARN é aquele a que será dado maior destaque por ser considerado o principal núcleo hipotalâmico envolvido na ingestão alimentar (Meister, 2007; Valassi *et al.*, 2008).

O ARN está localizado na região tuberal, a circundar a porção ventral do III ventrículo, considerado o terceiro maior núcleo do hipotálamo, com um volume aproximado de 0,94 mm<sup>3</sup> e é sexualmente dimórfico. Os seus neurónios são predominantemente bipolares ou unipolares, existindo poucos multipolares (Chronwall, 1985; Leal *et al.*, 1998). São pequenos e fusiformes e, lateralmente no núcleo, são mais largos e poligonais, com núcleo oval e abundante substância de Nissl no citoplasma (van den Pol e Cassidy, 1982; Chronwall, 1985). Este núcleo está envolvido na mediação da secreção da prolactina e da hormona de crescimento, na regulação do ciclo éstrico e do comportamento sexual; está ainda envolvido na regulação da função das glândulas tireoide e suprarrenal e nas respostas ao stress (Chronwall, 1985). O ARN tem uma importante ação no controlo e na coordenação da ingestão alimentar e do gasto energético (Meister, 2007; Valassi *et al.*, 2008; Vianna e Coppari, 2011). A complexidade de organização interna do ARN permite-lhe integrar informação endócrina e neuronal, de forma a modular respostas endócrinas e comportamentais que possibilitam a adaptação do indivíduo às mudanças ambientais (van den Pol e Cassidy, 1982; Chronwall, 1985; Bouret *et al.*, 2004). É um local importante para a regulação da ingestão alimentar, ao integrar sinais com origem periférica, que atravessam a barreira hematoencefálica e também sinais provenientes do tronco encefálico (Meister, 2007; Minor *et al.*, 2009). O ARN contém duas populações de neurónios de primeira ordem

que expressam os principais peptídeos envolvidos na ingestão alimentar e no gasto energético. Na parte ventromedial do núcleo são expressos os neuropeptídeos orexigénios, o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene *agouti* (*agouti-related protein* – AgRP) e na porção ventrolateral do núcleo são produzidos os mediadores com ação anorexigénia, a hormona estimuladora de melanócitos tipo alfa ( *$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone* –  $\alpha$ -MSH) e o transcrito regulado pela cocaína e pela anfetamina (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript* – CART) (Sandoval *et al.*, 2008; Maolood e Meister, 2010; Maior, 2012). Os axónios dessas duas populações neuronais do ARN projetam para os neurónios de segunda ordem, localizados em parte no PVN, estimulando a libertação de substâncias anorexigénias como a ocitocina, as hormonas libertadoras da tirotrofina e a corticotrofina. Os neurónios do ARN profetam ainda para o LH e para a área perifornical (*perifornical area* – PFA), e é aí que são produzidas moléculas que estimulam o apetite, como a hormona concentradora de melanina (MCH) e a orexina (Elias *et al.*, 1998).

## **2.1 Mediadores do ARN envolvidos na ingestão de alimentos/gasto de energia**

São conhecidos mais de 20 neurotransmissores envolvidos no comportamento alimentar que, quando expressos pelos neurónios do hipotálamo, levam à estimulação ou inibição da ingestão de alimentos e do gasto energético (Higuchi, 2012).

Estes mediadores são libertados quer no próprio hipotálamo, em outros núcleos relacionados com o comportamento alimentar, quer em regiões extra-hipotalâmicas, nomeadamente no tronco encefálico, desempenhando um papel importante no comportamento alimentar (Arora e Anubhuti, 2006). O ARN, devido à sua localização e à ausência de barreira hematoencefálica, é um importante local de ação destes mensageiros, promovendo a interação deste com outras áreas do SNC. O NPY, o  $\alpha$ -MSH e a dopamina



são alguns neurotransmissores expressos no ARN que desempenham um papel crucial nas ações relacionadas com a ingestão alimentar e gasto energético.

### **A) Neuropeptídeo Y**

O NPY, um peptídeo de 36 aminoácidos da família do polipeptídeo pancreático, foi isolado pela primeira vez em 1982 (Tatemoto *et al.*, 1982; Tatemoto, 1982) e é um dos mais abundantes peptídeos no SNC de mamíferos (Chronwall, 1985; Balasubramaniam, 1997; Minor *et al.*, 2009). É considerado o mais potente estimulador endógeno do apetite (Stanley e Leibowitz, 1985; Edwards *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2011), estando a sua ação bem preservada numa grande variedade de espécies (Minor *et al.*, 2009). O NPY é largamente distribuído no encéfalo, incluindo o hipotálamo, sendo o ARN e o DMN os núcleos onde a sua expressão é maior (Chronwall, 1985; Criscione *et al.*, 1998; Bi, 2007; Meister, 2007) com projeções para o LH, PVN e VMN (Chronwall, 1985). O ARN expressa NPY como primeira resposta à regulação da ingestão alimentar e gasto energético de curta e de longa duração (Minor *et al.*, 2009). O NPY é também encontrado no sistema nervoso periférico, em fibras do sistema nervoso simpático, sendo libertado destas fibras para órgãos periféricos como as células endoteliais do endocárdio, o intestino, o baço e a glândula suprarrenal e no sistema circulatório, havendo evidências de que os adipócitos também expressam NPY (Minor *et al.*, 2009). O NPY expresso no ARN está relacionado com a estimulação do apetite, o armazenamento de gordura e o ganho de peso, promovendo a diminuição da locomoção, do gasto energético e da temperatura corporal (Minor *et al.*, 2009). O NPY atua através de sete tipos de recetores (Y1 a Y7) acoplados a proteínas G (Balasubramaniam, 1997; Blomqvist e Herzog, 1997; Michel *et al.*, 1998). Os recetores Y1 e Y5 são expressos no hipotálamo e são considerados os mais ativos na regulação da ingestão alimentar e do gasto de energia (Kanatani *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 2008; Higuchi, 2012). Baixos níveis

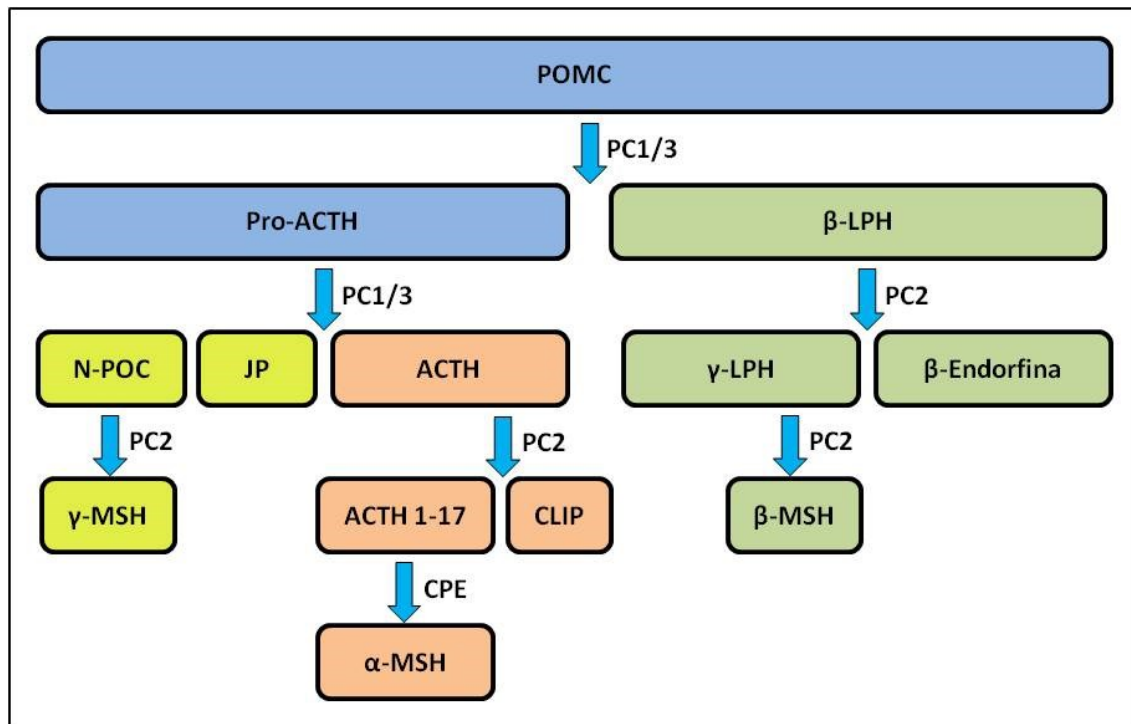
de leptina, de glicose e de insulina induzem um balanço energético negativo que está associado ao aumento da expressão de NPY no ARN. Para além da regulação da ingestão de alimentos, o NPY está ainda envolvido em outras funções fisiológicas importantes, nomeadamente na regulação do ritmo circadiano, na emoção, na aprendizagem, na reprodução e na regulação de funções cardiovasculares e gastrointestinais (Heilig e Widerlov, 1995; Sliwinska-Mosson *et al.*, 2013). O NPY parece estar também envolvido em mecanismos de resposta ao stress. Com efeito, a sua libertação dos nervos simpáticos para a circulação sanguínea foi reportada na inalação de éter em ratos, considerada como uma situação promotora de stress (Minor *et al.*, 2009). Adicionalmente, existe evidência de que a expressão deste neuropeptídeo no ARN apresenta dimorfismo sexual, sendo a sua expressão dependente dos níveis de estradiol circulante (Bauer-Dantoin *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1996; Santollo e Eckel, 2008; Silva *et al.*, 2010).

### **B) Hormona estimuladora de melanócitos tipo alfa**

O  $\alpha$ -MSH é constituído por treze aminoácidos e deriva da clivagem da pró-hormona pró-opiomelanocortina (POMC). Este peptídeo tem uma potente ação anorexigénia, tendo um papel crucial na regulação da homeostasia energética tanto no hipotálamo como em áreas extra-hipotalâmicas (Shimizu *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2016). O  $\alpha$ -MSH está também envolvido noutras funções, particularmente na pigmentação, no comportamento sexual e na inflamação. Das áreas do SNC que expressam abundantemente o POMC, salienta-se o NTS e o ARN (Dores *et al.*, 1986; Butler, 2006); já a nível periférico esta pro-hormona é expressa pela pele, baço, glândula tireoide e pelo trato gastrointestinal (Olney *et al.*, 2014b). O processo de pós-tradução do POMC envolve clivagem, através de duas convertases de pró-hormona, a PC1/3 e a PC2, e os produtos finais são duas classes de peptídeos: as melanocortinas (MCs) e o opióide  $\beta$ -endorfina. A clivagem do POMC nos peptídeos da

família MC dá origem à  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -MSH, e à hormona adrenocorticotrófica (ACTH) que partilham uma sequência de aminoácidos (His-Phe-Arg-Trp) necessários para a ação biológica destes peptídeos (Shimizu *et al.*, 2007; Olney *et al.*, 2014b). O processo de pós-tradução do POMC é específico para cada tecido (Pritchard *et al.*, 2002), o que permite obter vários peptídeos de uma única pró-hormona. Na hipófise, o POMC é clivado predominantemente em ACTH e  $\beta$ -lipotrofina (LPH). No entanto, no hipotálamo e no lobo intermedio da neuro-hipófise, o POMC dá origem ao ACTH, que depois é convertido em  $\alpha$ -MSH e, o restante fragmento N-terminal do POMC é novamente clivado produzindo  $\gamma$ -MSH e  $\beta$ -LPH, sendo estes últimos posteriormente convertidos em  $\beta$ -MSH e  $\beta$ -endorfina (Pritchard *et al.*, 2002) (Fig. 2).

As melanocortinas exercem a sua ação através de cinco tipos de recetores MC (MCRs) do tipo transmembranares acoplados à proteína G, designados por MC1-5R (Coll, 2007; Garfield *et al.*, 2009). Os recetores MC1R, MC2R e MC5R são abundantemente expressos nos tecidos periféricos. Os recetores MC3R e MC4R são também expressos nos tecidos periféricos, mas há uma predominância da sua expressão no encéfalo (Shimizu *et al.*, 2007; Olney *et al.*, 2014a, 2014b) sendo este o local eleito para a ação sobre a homeostasia energética (Butler, 2006). O neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH tem afinidade para os recetores MC3R e MC4R (Pritchard *et al.*, 2002) e destes, sabe-se que o MC4R tem um papel preponderante na inibição da ingestão alimentar (Marsh *et al.*, 1999), sendo densa a sua distribuição no PVN, DMN e LH (Liu *et al.*, 2003; Olney *et al.*, 2014b). É de salientar



**FIG. 2.** Modelo simplificado do processo de pós-tradução do POMC no hipotálamo. N-POC, fragmento N-terminal do POMC; JP, peptídeo de junção; ACTH, hormona adrenocorticotrófica; ACTH 1-17, de acetil do MSH; CLIP, peptídeo do lobo intermediário da adeno-hipófise semelhante a corticotrofina; LPH, lipotrofina; CPE, carboxipeptidase E; PC1/3, convertase de pró-hormona 1 e 3; PC2, convertase de pró-hormona 2. Baseado em Shimizu e colaboradores (2007) e Olney e colaboradores (2014b).

que o MC4R expresso no PVN participa na regulação da ingestão de alimentos, enquanto nos outros núcleos hipotalâmicos, a ativação destes recetores regula o gasto de energia (Balthasar *et al.*, 2005). O sistema MC é o único dos sistemas de neuropeptídeos que possui um antagonista endógeno, denominado de AgRP. Assim, o sistema MC engloba neurónios que expressam POMC, AgRP e os que expressam os recetores melanocortínicos (Butler, 2006). No SNC, o AgRP é expresso preferencialmente no ARN, já nos tecidos periféricos a sua expressão é predominantemente no córtex da glândula suprarrenal (Olney *et al.*, 2014b). O AgRP é sintetizado em neurónios do ARN que projetam para outros núcleos hipotalâmicos tais como o PVN, o VMN, o DMN e o LH, bem como para outras regiões como o NTS, a amígdala, o *bed nucleus* da estria terminal, a área tegmental ventral (*ventral tegmental area*

– VTA) e o núcleo accumbens (NAc) (Olney *et al.*, 2014b). O AgRP liga-se aos recetores MC3R e MC4R (Shimizu *et al.*, 2007), desencadeando uma ação antagonista ao do  $\alpha$ -MSH (Garfield *et al.*, 2009).

### **C) Dopamina**

A dopamina (DA) é considerada como a principal catecolamina do encéfalo (Kim *et al.*, 2010). Este neurotransmissor monoaminérgico é produzido pela descarbonização da L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). É também o precursor natural da adrenalina e da noradrenalina, que são catecolaminas com função excitatória no SNC (Meiser *et al.*, 2013). Na biossíntese da DA participa a enzima tirosina hidroxilase (TH) que converte o aminoácido L-tirosina em L-DOPA. Este aminoácido é depois descarboxilado pela enzima DOPA-descarboxilase ou pelo aminoácido aromático descarboxilase produzindo a DA (Meiser *et al.*, 2013). A DA é sintetizada principalmente na substância negra e na VTA, e está envolvida em várias funções neuronais tais como o controlo do movimento, a libertação de hormonas neuroendócrinas, o comportamento emocional, a recompensa, a cognição e a memória (Hornykiewicz, 1966; Kim *et al.*, 2010). À DA é-lhe ainda atribuído um papel no controlo da ingestão alimentar, visto ter uma participação relevante na regulação de mecanismos de recompensa, por meio de vias dopaminérgicas mesolímbicas (Berridge, 2007; Palmiter, 2007; Kim *et al.*, 2010). Deste circuito mesolímbico fazem parte várias áreas do SNC, mas há evidência de que o NAc e a VTA são as áreas-chave deste sistema (Volkow *et al.*, 2011a, 2011b). Por sua vez, estas áreas projetam para núcleos hipotalâmicos como o ARN (Kim *et al.*, 2010), sugerindo uma participação importante do hipotálamo nos mecanismos de recompensa associados à ingestão alimentar (Meguid *et al.*, 2000). Adicionalmente existem projeções dopaminérgicas para o LH, que parecem estar relacionadas com o tamanho das refeições e projeções para o VMN que têm como função influenciar o número de refeições (Zhang *et al.*, 2001). No sistema mesolímbico associado

à recompensa, existem vários mensageiros, nomeadamente a serotonina, a encefalina, o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a acetilcolina (ACH), que atuam em conjunto para promover a libertação de DA no NAc (Ribeiro e Santos, 2013). Este circuito é responsável por promover o prazer desencadeado por comportamentos naturais importantes para a sobrevivência do indivíduo e constitui a base neural para os fenómenos relacionados com o vício (Ribeiro e Santos, 2013). O apetite e a ingestão de alimentos são os únicos meios através dos quais se pode adquirir energia, no entanto, todos os tipos de resposta comportamental implicam gasto energético. Uma vez que a ingestão de alimentos desencadeia mecanismos associados à recompensa, este fenómeno é capaz de influenciar drasticamente a propensão para iniciar ou prosseguir a sua ingestão (Fulton, 2010). Existem vários tipos de recetores de dopamina (D1 a D5) que são classificados de acordo com a sua localização e a sua função (Lloyd e Dayan, 2016) e, particularmente, os recetores D1 e D2 estão associados à ingestão de alimentos (Kim *et al.*, 2010). Ambos os recetores são expressos no ARN (Ramos *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010; Manuel-Apolinar *et al.*, 2014; Romero-Fernandez *et al.*, 2014), o que sugere a participação de neurónios dopaminérgicos do ARN no comportamento alimentar, possivelmente nos mecanismos de prazer e recompensa desencadeados pelos alimentos. Os neurónios do ARN que expressam DA estão principalmente relacionados com a inibição da secreção de prolactina pela hipófise (Leite *et al.*, 2008). Contudo, há evidência de que os neurónios dopaminérgicos do ARN podem ter uma participação na ingestão de alimentos, uma vez que a coadministração de agonistas dos recetores DA diminui a ingestão de alimentos, o peso corporal e as concentrações de NPY no hipotálamo (Ramos *et al.*, 2005). Sabe-se também que a neurotransmissão dopaminérgica é facilitada pela melanocortina (Ramos *et al.*, 2005).

## **2.2 O núcleo arqueado no controle do comportamento alimentar**

O SNC recebe, através do NTS e do fluxo sanguíneo, numerosos estímulos neurais e hormonais – os sinais periféricos – oriundos de vários órgãos, como por exemplo, o tecido adiposo, o trato gastrointestinal e o pâncreas. Estes sinais periféricos participam ativamente nos dois mecanismos de coordenação da ingestão alimentar e do gasto energético, ou seja, na coordenação de ingestão de curta e de longa duração em resposta ao balanço energético que é constantemente modificado. Uma vez chegados ao ARN, os sinais são integrados e enviados para os neurónios de segunda ordem localizados noutros núcleos envolvidos no comportamento alimentar. Os sinais têm a capacidade de modular o apetite/reserva energética através da ativação de neurónios do ARN contendo NPY/AgRP ou pela inibição deste mecanismo, ao ativar os neurónios contendo  $\alpha$ -MSH/CART (Hallschmid *et al.*, 2004; Meister, 2007; Valassi *et al.*, 2008). Após a ingestão do alimento, a informação sensitiva recebida pelos recetores localizados na orofaringe e no estômago (particularmente no antro pilórico) é conduzida ao NTS e deste para o hipotálamo. Além da distensão mecânica, a estimulação química dos recetores na mucosa gastrointestinal e as hormonas libertadas pela mucosa gastrointestinal em resposta aos nutrientes, contribuem para a produção destes sinalizadores periféricos no trato gastrointestinal, no pâncreas e no tecido adiposo, tendo os sinais propriedades tanto orexigénicas como anorexigénias (Konturek *et al.*, 2004). Acresce-se que os sinais anorexigénios podem derivar tanto de respostas de saciedade como de adiposidade (Konturek *et al.*, 2004).

### **A) Sinais periféricos orexigénios**

A *greлина* é a principal hormona do trato gastrointestinal com propriedades orexigénias. É um peptídeo com 28 aminoácidos secretado primariamente por células endócrinas no estômago vazio (Riediger *et al.*, 2003). Os níveis séricos de grelina têm um

pico no jejum, antes das refeições, estabilizam no fim da refeição reduzindo a sua concentração até ao seu nível mais baixo, para aumentar novamente quando o estômago fica vazio (Arora e Anubhuti, 2006). O principal local de ação da grelina é o ARN, e tem por alvo os neurónios que expressam e libertam NPY/AgRP para o LH, induzindo o efeito orexigénio. A grelina também inibe os neurónios do ARN que expressam  $\alpha$ -MSH e projetam para o PVN, inibindo, desta forma, o efeito anorexigénio (Riediger *et al.*, 2003). A grelina atua por meio dos recetores endógenos de secretagogos da hormona de crescimento (Alamri *et al.*, 2016). As *orexinas A e B* são neuropeptídeos recentemente relacionados com a estimulação do apetite e a homeostasia de energia, sendo expressas centralmente no LH e na PFA, mas também são expressas periféricamente no intestino (Kirchgessner, 2002). A orexina-A é um peptídeo com 33 aminoácidos e a orexina-B é constituída por 28 aminoácidos (Sakurai, 1999). Tanto a orexina A como a B ativam os recetores OX1R e OX2R para mediar suas ações (Kirchgessner, 2002).

## **B) Sinais periféricos anorexigénios**

A sensação de saciedade, que ocorre imediatamente após uma refeição, é atribuída a numerosas moléculas de sinalização secretadas e libertadas pelo trato gastrointestinal com o objetivo final é a supressão da ingestão de alimentos. Estes sinais periféricos ligam-se a recetores existentes nos nervos aferentes que veiculam a informação para o SNC, estimulando o centro da saciedade e inibindo o centro de fome (Konturek *et al.*, 2004). Estas moléculas parecem estar envolvidas numa ação imediata através da regulação de curta duração da ingestão e do gasto energético (os sinais de saciedade), mas podem também participar na regulação de longa duração (os sinais de adiposidade) (Konturek *et al.*, 2005).



## 1. Sinais de saciedade

São gerados no trato gastrointestinal durante a refeição e regulam a quantidade de alimento ingerido, o valor energético da refeição e a duração de cada refeição (Konturek *et al.*, 2005). Após entrar no trato gastrointestinal, os nutrientes desencadeiam a secreção de vários peptídeos que ativam as fibras aferentes do nervo vago para o NTS, veiculando a informação de saciedade (Valassi *et al.*, 2008). Os mais importantes sinais periféricos de saciedade são a *colecistocinina* (CKK), o *peptídeo pancreático* (PP), o *peptídeo YY* (PYY), o *peptídeo tipo glucagon 1* (GLP-1), o *glucagon* e a *somatostatina*. O CKK foi o primeiro inibidor do apetite a ser identificado, tanto em humanos como em roedores. É um produto das células endócrinas I do duodeno e do jejuno e liga-se aos recetores CKK<sub>1</sub> existentes nas fibras aferentes do nervo vago, tendo uma participação importante na inibição de curta duração da ingestão de alimentos (Arora e Anubhuti, 2006). O PP é um peptídeo de 36 aminoácidos secretado principalmente nas células endócrinas PP do pâncreas. Os níveis circulantes de PP estão dependentes do estágio da digestão: a sua libertação é baixa no jejum e aumenta durante todas as fases da digestão (Konturek *et al.*, 2005). A ingestão de proteínas e de comida rica em gordura é um estímulo forte para a libertação de PP, que exerce a sua ação através dos recetores Y1 - Y5, levando à inibição da secreção pancreática e da motilidade gastrointestinal (Konturek *et al.*, 2005). O PYY é outro peptídeo constituído por 36 aminoácidos e está envolvido na regulação de curta duração da ingestão de alimentos (Valassi *et al.*, 2008). É produzido nas células L da mucosa do íleo e do cólon em resposta à ingestão de alimentos, principalmente ácidos gordos, e exerce os seus efeitos por meio dos recetores Y1 - Y3 e Y5. O PYY periférico é um conhecido inibidor do apetite e da ingestão de alimentos, quer em humanos quer em roedores, através da inibição da expressão de NPY/AgRP no ARN (Valassi *et al.*, 2008). Um outro sinal periférico de saciedade é o GLP-1, uma hormona secretada pelas células L da mucosa do íleo e do cólon em resposta à

ingestão de alimentos. A sua ação é mediada por diferentes recetores localizados nas fibras aferentes do nervo vago (Konturek *et al.*, 2005; Valassi *et al.*, 2008). O glucagon é um polipeptídeo de 29 aminoácidos que foi identificado e caracterizado por Kimball e Murlin em 1923. Esta hormona é secretada das células alfa dos ilhéus de Langerhans do pâncreas e desempenha um papel crucial na homeostasia da glicose, aumentando a glicogenólise e a libertação de glicose para o sistema circulatório (Gosmanov *et al.*, 2011). A somatostatina é um peptídeo de 14 aminoácidos, cuja produção a nível periférico é realizada pelas células delta dos ilhéus de Langerhans no pâncreas (Chandra e Liddle, 2014) e por outras células endócrinas do trato gastrointestinal. Este peptídeo é também expresso no SNC, nomeadamente no ARN. A somatostatina tem um papel na inibição da absorção de nutrientes pelo intestino, do esvaziamento gástrico e da secreção de glucagon, da insulina e do PP (Cuevas-Ramos e Fleseriu, 2014).

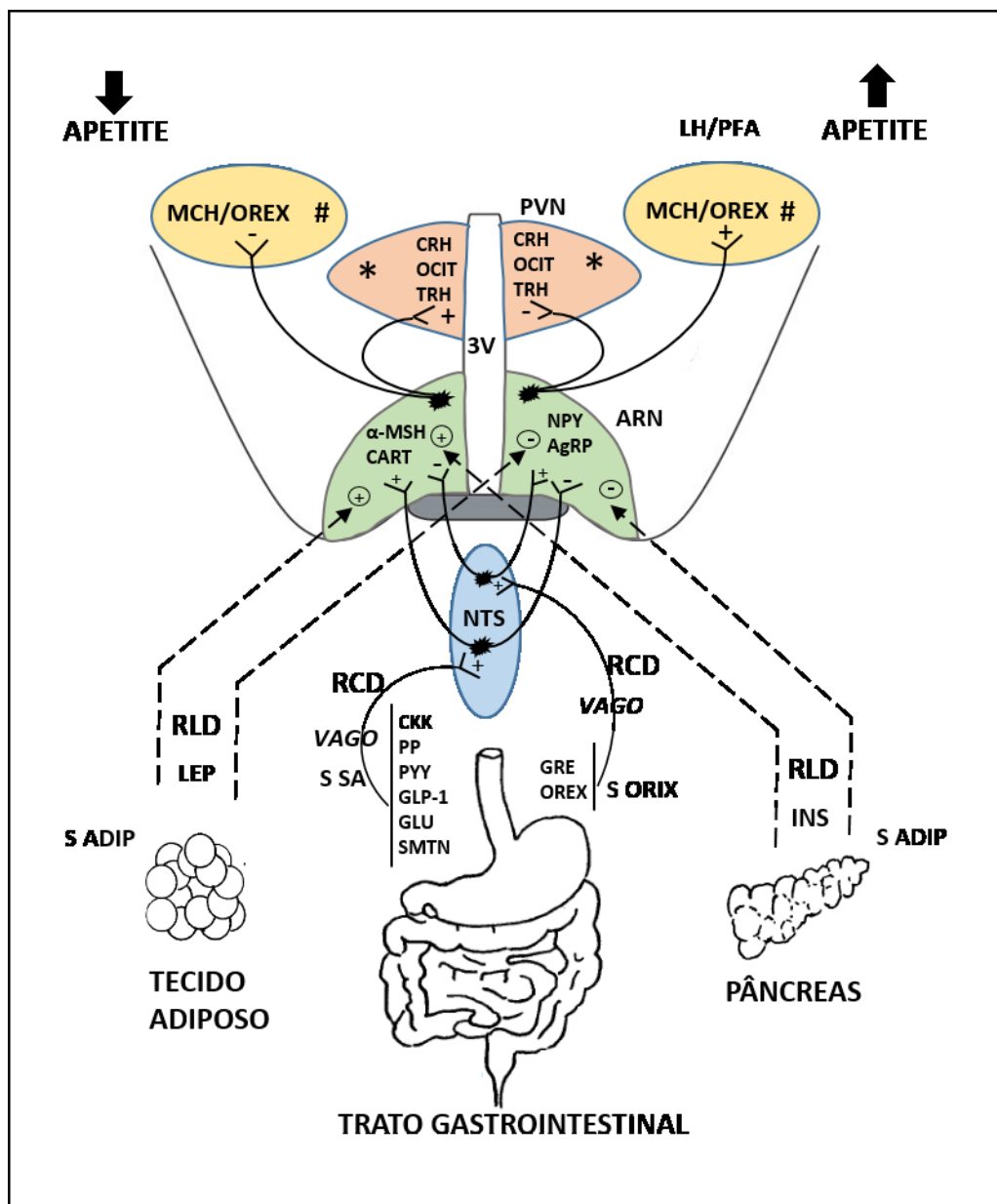
## 2. Sinais de adiposidade

O corpo, tanto do Homem como dos roedores, é constituído por três componentes básicos: os ossos, os músculos e a gordura. Destes elementos, o tecido adiposo é aquele que tem a função de reservatório energético, mas também contribui para a manutenção da temperatura corporal, protege os órgãos internos e é um dos tecidos responsáveis pela produção de hormonas periféricas envolvidas no controlo do apetite (konturek *et al.*, 2005). Uma dessas hormonas é a leptina, produzida pelos adipócitos e com uma ação fundamental na inibição do apetite (Zhang *et al.*, 1994; Feijóo-Bandín *et al.*, 2015). A leptina liga-se aos recetores específicos (Ob-R) que estão localizados nas fibras aferentes do nervo vago, mas que também são expressos pelos neurónios do ARN (Elmqvist *et al.*, 1998). Através dos recetores Ob-R, a leptina inibe a expressão de NPY/AgPR e, simultaneamente estimula a expressão do neuropeptídeo anorexigénio, o  $\alpha$ -MSH, sendo o resultado final a sensação de

saciedade (Schwartz *et al.*, 1999; Higuchi *et al.*, 2008; Valassi *et al.*, 2008). Existe uma grande interação entre os efeitos da grelina e os efeitos da leptina, que foi considerada por Konturek e colaboradores (2005) como “o tango argentino grelina-leptina”, uma vez que cada uma exerce efeito antagónico no controlo do apetite, além do que a grelina controla negativamente os níveis plasmáticos de leptina e *vice versa*, sendo o efeito da grelina sobre a leptina mais eficiente (Konturek *et al.*, 2005).

O outro importante sinal periférico de adiposidade é a insulina, uma proteína produzida pelas células  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans do pâncreas e com um papel relevante na inibição da ingestão de alimentos (Burks *et al.*, 2000). No hipotálamo, a insulina liga-se a seus recetores específicos e, através destes, estimula as vias do  $\alpha$ -MSH e do CART, mas também inibe a atividade de neurónios que expressam NPY/AgRP, resultando numa estimulação dos centros da saciedade (Arora e Anubhuti, 2006; Valassi *et al.*, 2008; Sadagurski *et al.*, 2013).

Os sinais periféricos de fome ou de saciedade, tanto de curta como de longa duração, têm como principal alvo o ARN, onde induzem variações na expressão e libertação de neuropeptídeos orexigénios e anorexigénios que são depois enviados, através de projeções, para outros núcleos envolvidos na regulação do comportamento alimentar. Como resultado final, estes sinais desencadeiam, no indivíduo, a promoção ou inibição da ingestão alimentar e do gasto energético. Dado ser fundamentada e importante a contribuição do ARN para o controlo do comportamento alimentar, as alterações que podem ocorrer neste núcleo vão, sem dúvida, comprometer o adequado funcionamento dos circuitos envolvidos na homeostasia energética e podem desencadear uma série de desequilíbrios na ingestão/gasto energético (Fig. 3).



**FIG. 3.** Representação esquemática das vias centrais envolvidas na regulação da ingestão de alimentos. ARN, núcleo arqueado; PVN, núcleo paraventricular; LH, hipotálamo lateral; PFA, área perifornical; NTS, núcleo do trato solitário; RLD, regulação de longa duração; RCD, regulação de curta duração; S SA, sinais de saciedade; S ORIX, sinais orexigénios; S ADIP, sinais de adiposidade; GRE, grelina; OREX, orexina; CKK, colecistocinina; PP, peptídeo pancreático; PYY, peptídeo YY; GLP-1, peptídeo tipo glucagon; GLU, glucagon; SMTN, somatostatina; LEP, leptina; INS, insulina; NPY, neuropeptídeo Y; AgRP, peptídeo relacionado ao gene agouti;  $\alpha$ -MSH, hormona estimuladora de melanócitos-alfa; CART, transcrito regulado pela cocaína e pela anfetamina; CRH, hormona libertadora da corticotropina; OCIT, ocitocina; TRH, hormona libertadora da tirotrofina; MCH, hormona concentradora de melanina; #, peptídeos orexigénios; \*, peptídeos anorexigénios. Baseado em Konturek e colaboradores (2005) e Valassi e colaboradores (2008).

### 3. Hormonas ováricas e comportamento alimentar

As flutuações hormonais que ocorrem ao longo do ciclo ovárico, nas mulheres, e do ciclo éstrico, nos animais, induzem variações na quantidade e na frequência de alimento ingerido (Buffenstein *et al.*, 1995; Dye e Blundell, 1997; Eckel *et al.*, 2004, 2011; Becker *et al.*, 2005; Asarian e Geary, 2013; Santollo e Daniels, 2015). A variação do padrão alimentar observada no género feminino é atribuída à influência das hormonas ováricas, em especial ao estradiol (Drewett, 1973, Asarian e Geary, 2002; Yu *et al.*, 2011). A ingestão de alimentos é maior nas fases em que o nível de estradiol é mais baixo, ou seja, no diestro nos animais e no período pré-ovulatório nas mulheres e após a menopausa, quer natural quer cirúrgica (Buffenstein *et al.*, 1995; Dye e Blundell, 1997; Eckel *et al.*, 2004, 2011; Becker *et al.*, 2005; Asarian e Geary, 2013; Santollo e Daniels, 2015). Drewett (1973) apontou dois componentes para esta inibição da ingestão de alimentos: um efeito tónico e um efeito cíclico ou fásico. A inibição tónica é atribuída ao aumento dos níveis basais de ingestão alimentar em animais ovariectomizados quando comparado com o nível máximo de alimento ingerido por animais intactos e cíclicos. O efeito cíclico ou fásico corresponde à diminuição da ingestão de alimento durante a fase reprodutiva, quando os níveis hormonais são elevados. No entanto, coube a Asarian e Geary (2002) mostrar que o estradiol não só é responsável pelo efeito tónico, facto que havia já sido demonstrado por Varma e colaboradores (1999), como também induz a diminuição cíclica da ingestão de alimentos. Com efeito, o estradiol afeta a expressão de peptídeos relacionados com o comportamento alimentar e o gasto energético, nomeadamente, o POMC, o  $\alpha$ -MSH (Medina *et al.*, 1998; Hirosawa *et al.*, 2008; Cyr *et al.*, 2013), o NPY (Crowley *et al.*, 1985; Baskin *et al.*, 1995; Clegg *et al.*, 2007; Santollo e Eckel, 2008; Silva *et al.*, 2010), assim como o sistema dopaminérgico (DeMaria *et al.*, 2000; Ben-Jonathan e Hnasko, 2001; Oomizu *et al.*, 2003). Foi sugerida a existência de uma ação direta

do estradiol nos neurónios que expressam estes peptídeos, por ativação dos seus recetores específicos, que são abundantemente expressos no ARN e são coexpressos com estes peptídeos (Sar *et al.*, 1990; Leite *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2011).

### 3.1 Estradiol

Nas mulheres e nas fêmeas, os estrogénios são as hormonas ovárias responsáveis pelo desenvolvimento e regulação do sistema reprodutivo e dos seus caracteres sexuais secundários. Estes pertencem ao grupo de hormonas esteroides com 18 átomos de carbono, secretados principalmente pelo ovário e, em menor quantidade, pelas glândulas suprarrenais. O termo estrogénio compreende três hormonas esteroides estruturalmente semelhantes: a estrona, o estradiol e o estriol. Em mamíferos, o 17- $\beta$ -estradiol é o principal esteroide com propriedades estrogénicas (Ignacio *et al.*, 2009). O estradiol é sintetizado em quase todos os grupos de vertebrados (Ryan, 1982) e em alguns insetos (Mechoulam *et al.*, 1984), mostrando a sua importância evolutiva. A ação do estradiol ocorre através da ativação dos seus recetores, denominados recetor de estrogénio tipo alfa (*estrogen receptor alpha* – ER $\alpha$ ) e recetor de estrogénio tipo beta (*estrogen receptor beta*) (Kuiper *et al.*, 1996; Koike *et al.*, 1987; Prossnitz *et al.*, 2008). Estes recetores são fatores de transcrição, membros da superfamília de recetores nucleares que interagem diretamente com genes regulados pelo estrogénio (Carson-Jurica *et al.*, 1990; Bjornstrom e Sjoberg, 2005, Vasudevan e Pfaff, 2007). De entre estes recetores, a ativação do ER $\alpha$  está diretamente relacionada com o efeito inibitório do estradiol no comportamento alimentar (Geary *et al.*, 2001; Roesch, 2006).

### 3.2 Ciclo éstrico

O ciclo éstrico, que equivale ao ciclo menstrual (ovário) nas mulheres, pode ser definido como um conjunto cíclico de modificações que ocorrem no aparelho reprodutor das fêmeas de mamíferos (Cardozo, 2002). Estas modificações são periódicas e influenciam o comportamento alimentar, a cognição, o comportamento sexual, a emotividade, entre outros (McEwen e Alves, 1999; Pfaff *et al.*, 2000; McEwen *et al.*, 2015). A duração do ciclo éstrico nos roedores é, em média, de 4-5 dias e compreende quatro fases sucessivas, que são consequência da flutuação cíclica das hormonas ovárias: proestro, estro, metestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (Pinto-Machado, 1966; Marcondes *et al.*, 2002). Entre a fase do diestro e proestro inicia-se a produção crescente de estradiol que alcança o seu pico no proestro e retorna aos seus valores basais no estro (Pinto-Machado, 1966; Marcondes *et al.*, 2002). A progesterona atinge o seu pico poucas horas após o pico de estradiol, retornando a valores basais no estro. No metestro há um segundo pico, menor, de produção de progesterona que diminui no diestro (Pinto-Machado, 1966; Marcondes *et al.*, 2002). Uma vez que o epitélio vaginal sofre alterações celulares como consequência da influência hormonal ao longo do ciclo éstrico, as diferentes fases podem ser determinadas pelos tipos de células presentes no esfregaço vaginal (Pinto-Machado, 1966; Cardozo, 2002; Marcondes *et al.*, 2002). O *proestro* é uma fase anabólica, ou seja, preparativa e construtiva que, nos ratos, dura aproximadamente 12 horas. Neste período, há um pico de estradiol seguido de um pico de progesterona. A citologia vaginal caracteriza-se pela presença de células epiteliais nucleadas a que se juntam, na fase terminal, algumas células queratinizadas. O *estro* é uma fase anabólica que, nos ratos, dura aproximadamente 24 horas. Na noite de transição da fase de proestro para estro, as fêmeas tornam-se recetivas, ocorre o evento da ovulação e é o momento do acasalamento. Esta fase é caracterizada pelo retorno aos níveis basais do estradiol e da progesterona. O esfregaço vaginal mostra principalmente células

queratinizadas. O *metestro* é um período catabólico, no qual ocorrem mudanças degenerativas no sistema reprodutor e que dura aproximadamente 12 horas nos ratos. Caracteriza-se por um segundo pico de progesterona secretada pelo corpo lúteo. O esfregaço é essencialmente dominado pela presença de leucócitos, mas estão presentes algumas células epiteliais nucleadas ou queratinizadas. O *diestro* é uma fase quiescente que dura aproximadamente 60 horas. Caracteriza-se por baixos níveis de estradiol e progesterona circulantes e o exame citológico mostra poucas células epiteliais nucleadas e poucos leucócitos.

### **3.3 Recetor de estrogênio tipo alfa**

O ER $\alpha$ , clonado em 1987 por Koike e colaboradores, é o mais estudado e descrito em várias regiões do encéfalo, incluindo o hipocampo, o hipotálamo e o córtex cerebral, numa grande variedade de espécies (Shughrue *et al.*, 1997; Mitra *et al.*, 2003; Cushing e Wynne-Edwards, 2006). O ER $\alpha$  apresenta um padrão de distribuição sexualmente dimórfico em algumas regiões do encéfalo e a sua expressão varia com os níveis circulantes de estradiol, geralmente aumentando com a ovariectomia e diminuindo com a administração de estradiol (Simerly *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 2011). Este recetor está envolvido numa série de funções fisiológicas, quer durante o desenvolvimento do organismo quer na sua idade adulta, nomeadamente na diferenciação de núcleos sexualmente dimórficos, na reprodução, no comportamento social, na afiliação e na agressão (Dohler *et al.*, 1984; Ogawa *et al.*, 1998; McEwen e Alves, 1999; Choleris *et al.*, 2003; Rissman, 2008). Este recetor desempenha um importante papel no comportamento alimentar, uma vez que medeia o efeito inibitório do estradiol na ingestão alimentar (Geary *et al.*, 2001; Roesch, 2006). O ER $\alpha$  é densamente expresso no ARN (Chakraborty *et al.*, 2003, 2008; Yamada *et al.*, 2009), sendo coexpresso com o NPY (Sar *et al.*, 1990), com o POMC (de Souza *et al.*, 2011) e com a DA (Leite *et*



*al.*, 2008) evidenciando o seu papel no comportamento alimentar e sugerindo uma possível relação com o dimorfismo sexual observado neste.

#### 4. Álcool

O álcool (etanol) é das substâncias psicoativas mais utilizadas e aceitas pela sociedade, tendo sido o seu uso promovido em muitas culturas. Estima-se que a sua primeira utilização tenha ocorrido na China, há cerca de 10.000 anos, onde foi produzido a partir da fermentação natural de arroz, uvas e cerejas (Hermano, 2013). Ao longo do tempo, foram introduzidas novas formas de bebidas alcoólicas que, pouco a pouco, passaram a ser produzidas em escala industrial e tornaram-se largamente disponíveis. Atualmente, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), calcula-se que haja 2 mil milhões de consumidores de álcool no mundo. No entanto, apesar da sua aceitação social e cultural e do seu fácil acesso, o consumo de bebidas alcoólicas pode trazer sérias consequências tanto a nível individual como socioeconómico, uma vez que o seu consumo pode causar dependência e conduzir ao alcoolismo (Shelkar *et al.*, 2015).

Apesar de ser conhecido desde os tempos remotos, a medicina só passou a considerar o consumo de bebidas alcoólicas como um problema no século XVIII, quando Benjamim Rush, líder político, médico, escritor e educador norte-americano, descreveu os seus efeitos no corpo e na mente humana, e atribuiu a estes efeitos a condição de doença. O termo *alcoolismo* foi proposto em 1849 pelo médico suíço Magnus Huss, para definir o conjunto de males vinculados ao consumo excessivo e prolongado de bebidas alcoólicas, ou seja, o termo refere-se às consequências somáticas e aos efeitos nocivos que a ingestão crónica proporciona e não ao consumo excessivo de bebidas alcoólicas (Hermano, 2013).

Segundo o Relatório Mundial de Álcool e Saúde de 2014 da OMS, o consumo abusivo de álcool é a causa de mais de 200 doenças, entre as quais o alcoolismo, a cirrose hepática, doenças cardiovasculares, vários tipos de carcinomas e a síndrome alcoólica fetal. Recentemente, o uso abusivo de álcool foi associado também a doenças infecciosas como a tuberculose e a síndrome da imunodeficiência adquirida (OMS, 2014). Cerca de 6% de todas as causas de mortes no mundo são direta ou indiretamente atribuídas ao consumo de álcool (OMS, 2014). Para além disto, o álcool está relacionado com inúmeras consequências sociais, como a violência, o desemprego e o absentismo, que acarretam um elevado custo socioeconómico. Estima-se que o Brasil gaste cerca de 7,3% do seu Produto Interno Bruto (PIB) em consequência do consumo de álcool, que foi em 2014, de aproximadamente 372 mil milhões de reais (Abreu, 2015). A economia portuguesa também é afetada pelas consequências do consumo excessivo de álcool, sendo que em 2010 teve um gasto de aproximadamente 0,13% do seu PIB, cerca de 191 milhões de euros (Cortez-Pinto *et al.*, 2010). A média de consumo mundial de álcool puro foi, em 2010, de 6,2 litros por pessoa com idade igual ou superior a 15 anos, o que significa um consumo de 13,5 g de álcool puro por dia (OMS, 2014). Este valor equivale a mais do que uma dose padrão de álcool por dia (que contém aproximadamente 10 a 12 g de álcool puro; OMS), equivalendo a uma lata de cerveja ou “chope” (330 ml), um copo de vinho (100 ml) ou uma dose de “destilado” (30 ml).

*Álcool* é o termo utilizado na linguagem corrente para se referir ao etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  ou  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) ou álcool etílico, uma substância orgânica obtida por meio da fermentação de alimentos que contêm açúcares (Vieira, 2012). O álcool está presente em bebidas como cerveja, vinho e aguardente, assim como na indústria de perfumaria e como combustível de motores de explosão em alguns países como o Brasil. O etanol é o mais comum dos álcoois, compostos que têm um grupo hidroxilo ligado a um átomo de carbono

saturado (Vieira, 2012). É uma molécula de baixo peso molecular e hidrossolúvel e, quando ingerido, é absorvido rapidamente no estômago (20%) e intestino delgado (80%). O pico de concentração plasmática de etanol ocorre entre meia hora até uma hora e meia após a ingestão (Oga, 1996). A sua absorção é rápida no início do consumo, diminuindo logo depois, mesmo que o etanol esteja ainda em concentrações elevadas no estômago. Os mais importantes fatores que determinam as variáveis taxas de absorção de álcool, observadas em diferentes indivíduos ou circunstâncias, são o tempo de esvaziamento gástrico e o início da absorção intestinal. A presença de alimentos no estômago retarda a absorção do etanol por este órgão. No entanto, quando o álcool chega ao intestino delgado, a sua absorção é rápida e completa, mesmo na presença de alimentos (Oga, 1996; Vieira, 2012). O etanol é absorvido diretamente pela mucosa do trato gastrointestinal sem digestão prévia e, após ser absorvido, a sua distribuição é rápida e, dada a sua solubilidade tanto em meio aquoso como em meio lipídico, faz com que atravesse todos os tecidos (Oga, 1996; Vieira, 2012). Apenas 10% do álcool ingerido é eliminado pelos pulmões, suor e urina; os restantes 90% são metabolizados no fígado (Vieira, 2012). O metabolismo do álcool ocorre principalmente por reações oxidativas, sobretudo pela ação da enzima álcool desidrogenase (ADH). Esta enzima catalisa a oxidação do etanol a acetaldeído, processo que fornece energia ao organismo (7,1 kcal/g) (Kachani *et al.*, 2008). Há ainda duas outras vias de oxidação do etanol: a via do sistema mitocondrial de oxidação do etanol, presente no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, e a via da catalase, encontrada nos peroxissomas dos hepatócitos, responsável por apenas 10% da biotransformação do etanol. Estas duas últimas vias consomem energia ao invés de a gerar (Kachani *et al.*, 2008). As três vias produzem metabolitos específicos que resultam na formação de acetaldeído, um produto tóxico, causador de uma série de danos celulares, como alterações de proteínas e mitocôndrias, inibição de processos de reparação do ácido desoxirribonucleico – DNA, sendo também indutor de respostas pró-inflamatórias

e pró-fibrogénicas, contribuindo para a progressão da lesão hepática (Vieira, 2012). Uma outra via de metabolização do etanol é a não oxidativa, que envolve a esterificação do etanol, conduzindo à formação de ésteres etílicos de ácidos gordos (Bucho, 2012).

O álcool é removido do sangue a uma taxa que varia entre 10 a 25 mg de álcool/100 ml de sangue/hora, valor este que varia de acordo com a constituição física (peso/altura), o sexo, a ocasião do consumo e a quantidade de álcool ingerida (Roberts e Robinson, 2007). Os efeitos do consumo de álcool parecem ser diferentes entre homens e mulheres, uma vez que a concentração de álcool no sangue tende a ser maior nas mulheres do que nos homens, provavelmente devido ao maior volume sanguíneo dos homens. Adicionalmente, o género feminino possui uma menor quantidade de enzimas álcool desidrogenase no estômago, menor quantidade de água corporal e maior quantidade de tecido adiposo, levando as mulheres a absorverem mais 30% de álcool que os homens (Nóbrega e Oliveira, 2005; Almeida *et al.*, 2009; Bucho, 2012).

#### **4.1 O etanol no comportamento alimentar**

O etanol atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e rapidamente chega ao SNC. O seu consumo crónico e excessivo induz alterações quer na estrutura quer na função de várias áreas do SNC, tanto no Homem como em animais experimentais (Madeira *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2002a; Harper, 2009; Mukherjee, 2013). O hipotálamo é uma das áreas encefálicas afetadas pelo consumo do etanol, que é o causador de alterações estruturais, tais como a degenerescência celular e a perda de sinapses (Tavares e Paula-Barbosa, 1984; Madeira e Paula-Barbosa, 1999; Harper, 2009), bem como indutor de modificações na expressão de uma variedade de neurotransmissores envolvidos em diferentes funções neuronais (Madeira e Paula-Barbosa, 1999; Silva *et al.*, 2002a; Harper, 2009). Embora alguns desses danos sejam reversíveis ou parcialmente reversíveis após a abstinência do

consumo de álcool (Silva *et al.*, 2002b, 2009; Pereira *et al.*, 2014), muitos são permanentes (Silva *et al.*, 2002a, 2009; Silva e Madeira, 2012). Em consequência das alterações neuronais induzidas pela exposição ao etanol e/ou pela sua abstinência, várias funções fisiológicas são afetadas, tal como o controlo endócrino da hipófise e de outras glândulas (Madeira e Paula-Barbosa, 1999).

O comportamento alimentar e o ganho de peso são funções fisiológicas que parecem ser afetadas pelo consumo e pela abstinência ao álcool, uma vez que animais submetidos à ingestão crónica de etanol apresentam alterações na ingestão alimentar e no ganho de peso (Patterson-Buckendahl *et al.*, 2005; Suter, 2005; Carneiro *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009). Além disso, o etanol é um macronutriente cujo consumo é controlado pelos mesmos peptídeos hipotalâmicos e circuitos cerebrais que regulam a ingestão de alimentos e o ganho de peso (Egli, 2003; Thiele *et al.*, 2003). De facto, há evidências da participação do ARN no consumo de etanol, envolvendo a expressão, neste núcleo, de importantes neurotransmissores relacionados com a ingestão de alimentos: o NPY (Caberlotto *et al.*, 2001; Roy e Pandey, 2002; Thiele e Badia-Elder, 2003; Thiele *et al.*, 2004a, 2004b) e o sistema MC, especificamente o  $\alpha$ -MSH (Kinoshita *et al.*, 2000; Kokare *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2008, 2013; Olney *et al.*, 2014a, 2014b; Shelkar *et al.*, 2015). O consumo de etanol afeta também o sistema dopaminérgico encefálico (Kim *et al.*, 1997; Sarkola *et al.*, 1999; Oomizu *et al.*, 2003; Gangisetty *et al.*, 2015) e afeta a secreção de prolactina, induzindo a hiperprolactinemia em humanos e em animais (Sarkar, 2010; Li *et al.*, 2011), sugerindo a participação do ARN na ingestão de etanol com possíveis implicações para a ingestão alimentar e para o ganho de peso. Os sinais periféricos mediadores do apetite, como a leptina, podem também estar envolvidos nestes mecanismos, uma vez que foi postulada a existência de uma relação entre esta hormona e o etanol (Kiefer *et al.*, 2001; Wurst *et al.*, 2003).

## 4.2 O etanol no sexo feminino

Outro aspeto importante observado após a ingestão de etanol e também na sua abstinência, é o dimorfismo sexual nos danos causados, uma vez que machos e fêmeas diferem nas suas respostas ao consumo e/ou abstinência ao etanol, apresentando as fêmeas maior suscetibilidade, ou seja, maior severidade de danos (Sohrabji, 2002; Sullivan *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2009; Silva e Madeira, 2012). A exposição ao etanol afeta também o ciclo éstrico de fêmeas de roedores intactas e cíclicas, promovendo o prolongamento das fases de metestro e diestro, que não é revertido pela abstinência (Silva e Madeira, 2012). No entanto, a exposição crónica ao etanol e a sua abstinência não parecem afetar a síntese e a libertação de estrogénio e progesterona em fêmeas intactas e cíclicas (Silva *et al.*, 2009). Nas mulheres, o ciclo menstrual e a fertilidade também são afetados pela exposição ao etanol (Almeida *et al.*, 2009). Ainda assim, há poucos estudos que avaliam os efeitos do etanol e da sua abstinência no SNC de fêmeas, assim como o efeito do álcool no seu comportamento alimentar.

O comportamento alimentar é uma função fisiológica que envolve uma complexa cadeia de elementos, quer periféricos, quer centrais e que, particularmente nas fêmeas, é altamente influenciada pelo estradiol. O ARN é uma estrutura central na coordenação do comportamento alimentar, uma vez que um grande número dos seus neurónios estabelece conexões recíprocas com núcleos hipotalâmicos e com áreas extra-hipotalâmicas envolvidos na regulação da fome e da saciedade. Sabe-se que, tanto a morfologia como a composição neuroquímica do ARN das fêmeas parecem ser influenciadas pelas concentrações plasmáticas de estradiol e que as fêmeas são mais sensíveis os efeitos do etanol do que os machos.

Desta forma, com os trabalhos apresentados nesta tese, pretendeu-se:

(1) Avaliar o papel do estradiol no comportamento alimentar e na expressão de neuropeptídeos orexigénicos e anorexigénios no ARN e verificar a existência de uma relação entre a neuroquímica deste núcleo e a modulação da resposta alimentar;

(2) Avaliar o efeito do etanol e da sua abstinência no comportamento alimentar, na estrutura do ARN e na expressão de neuropeptídeos orexigénicos, anorexigénios e de TH neste núcleo, dado que esses peptídeos participam nos circuitos cerebrais de controlo da ingestão alimentar e do ganho de peso. Como o modelo foi desenvolvido em fêmeas, foi ainda objetivo deste estudo avaliar os efeitos do etanol e da sua abstinência na expressão de ER $\alpha$  no ARN.

A execução prática destes estudos comportou a utilização de métodos estereológicos (Gundersen e Jensen, 1987; West *et al.*, 1991; Gundersen *et al.*, 1998, 1999) para estimar o número total de neurónios do ARN que expressam NPY e  $\alpha$ -MSH em fêmeas ovariectomizadas suplementadas ou não com benzoato de estradiol (*estradiol benzoato* – EB) (**trabalho 1**) e para estimar o volume e o número total de neurónios do ARN, bem como o número total de neurónios do ARN que expressam NPY,  $\alpha$ -MSH, TH e ER $\alpha$  em ratos fêmeas intactas submetidas a seis meses de consumo de etanol e após dois meses de abstinência de etanol (**trabalho 2**).

## **OBJETIVOS**



## **Objetivo geral**

Avaliar o efeito do estradiol, e do etanol e da sua abstinência nas respostas morfológicas e de expressão peptídica no núcleo arqueado de ratos Wistar fêmeas e a possível correlação destas respostas com o comportamento alimentar dos animais.

## **Objetivos específicos**

- i. Avaliar os efeitos do estradiol na expressão do NPY e do  $\alpha$ -MSH por neurónios do ARN em fêmeas ovariectomizadas tratadas ou não com EB e tentando estabelecer uma possível relação entre a expressão peptídica e o comportamento alimentar dos animais.
- ii. Avaliar os efeitos do tratamento com etanol e da sua abstinência na morfologia do ARN.
- iii. Avaliar se a exposição crónica ao etanol e/ou a sua abstinência afetam a neuroquímica do ARN, especificamente a expressão do NPY, do  $\alpha$ -MSH, do ER $\alpha$  e o do TH.
- iv. Avaliar a correlação das possíveis alterações morfológicas e neuroquímicas do ARN com o comportamento alimentar dos animais expostos ao álcool e à sua abstinência.

## **TRABALHOS CIENTÍFICOS**

***Regulation of NPY and  $\alpha$ -MSH expression by estradiol in arcuate nucleus of Wistar female rats: a stereological study.***

Rebouças ECC, Leal S, Sa SI.

Neurological Research, 2016.



## Regulation of NPY and $\alpha$ -MSH expression by estradiol in the arcuate nucleus of Wistar female rats: a stereological study

Elce C.C. Rebouças, Sandra Leal & Susana I. Sá

To cite this article: Elce C.C. Rebouças, Sandra Leal & Susana I. Sá (2016): Regulation of NPY and  $\alpha$ -MSH expression by estradiol in the arcuate nucleus of Wistar female rats: a stereological study, *Neurological Research*, DOI: [10.1080/01616412.2016.1203124](https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1203124)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01616412.2016.1203124>



Published online: 30 Jun 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ynr20>

# Regulation of NPY and $\alpha$ -MSH expression by estradiol in the arcuate nucleus of Wistar female rats: a stereological study

Elce C.C. Rebouças<sup>1,2,3</sup>, Sandra Leal<sup>2,3,4</sup> , Susana I. Sá<sup>2,3</sup> 

<sup>1</sup>Department of Natural Sciences, State University of Southwest of Bahia, Bahia, Brazil, <sup>2</sup>Faculty of Medicine, Department of Anatomy, University of Porto, Porto, Portugal, <sup>3</sup>Faculty of Medicine, Center for Health Technology and Services Research (CINTESIS), University of Porto, Porto, Portugal, <sup>4</sup>Department of Sciences, Institute of Research and Advanced Training in Health Sciences and Technologies (IINFACETS), Advanced Institute of Health Sciences-North (ISCS-N), CESPU, CRL, Gandra, Portugal

**Objectives:** Feeding behavior in both animals and humans is modulated by estrogens, as shown by the increased adiposity observed in women and rats upon the drop of estradiol levels at menopause. Estradiol action on food intake is mediated through its cognate receptors within several hypothalamic nuclei, namely the arcuate nucleus (ARN). The ARN contains two neuronal populations expressing peptides that exert opposing effects on the central control of feeding: the orexigenic neuropeptide Y (NPY) and the anorexigenic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH).

**Methods:** To understand the role played by estradiol in the modulation of food intake, we have used an animal model of cyclic 17 $\beta$ -estradiol benzoate (EB) administration and stereological methods to estimate the total number of neurons immunoreactive for NPY and  $\alpha$ -MSH in the ARN of ovariectomized rats.

**Results:** Present results show that the experimentally induced EB cyclicity prompted a decrease in food consumption and in body weight. Data also show that ovariectomy induced an increase in NPY expression and a decrease in  $\alpha$ -MSH expression in the ARN that were reverted by EB administration. Conversely, EB blocked the expression of NPY and increased the synthesis of  $\alpha$ -MSH in ARN neurons, without affecting the overall sum of NPY and  $\alpha$ -MSH neurons.

**Discussion:** These results suggest that estradiol affects food intake and, consequently, body weight gain, through an overriding mechanism superimposed in the physiological balance between both peptides in the ARN of female rats.

**Keywords:** Estrogen, Neuropeptide Y,  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone, Arcuate nucleus, stereology, Immunohistochemistry

## Introduction

Food intake and energy expenditure are complex behaviors regulated by central and peripheral mechanisms that are dependent on gender, genetic, and environmental factors.<sup>1–3</sup> In women, the role of estradiol in the control of food intake and energy expenditure is evidenced by the fact that after menopause, there is an increase in adiposity, which is a risk factor for the development of diabetes and cardiovascular diseases.<sup>1,4,5</sup> Moreover, women eat less at the pre-ovulatory phase, when estradiol levels are high, and eat more at the postovulatory phase, when estradiol levels are low.<sup>6,7</sup> Similarly, studies in rodents have shown that they eat less at proestrus than at diestrus,<sup>6,8</sup> reaching the lowest level of ingestion at the behavioral estrous,<sup>7,9,10</sup> a period of altered behavioral expression that coincides with the end of proestrus and the start of the estrus stage

of the cycle.<sup>9</sup> In addition, hormone fluctuations along the ovarian cycle influence the amount of food ingested, inducing a cyclic inhibitory effect of estradiol on eating.<sup>7,11</sup> It was also shown that ovariectomy induces hyperphagia and weight gain, which is evidence of the tonic inhibitory effect of estradiol, and that this effect is reversed by estradiol treatment.<sup>1,12</sup>

Food intake and energy expenditure are coordinated by the hypothalamus. Within this brain region, the arcuate nucleus (ARN) stands as a pivotal center in the integration and distribution of peripheral information from hormonal to neuronal signals that reflect the metabolic status.<sup>13,14</sup> The ARN shares extensive connections with the paraventricular nucleus and the lateral hypothalamic and perifornical areas are important pathways of neuropeptide transport for the control of energy balance.<sup>15,16</sup> The ARN contains the largest collection of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y (NPY) and ( $\alpha$ -MSH),<sup>17</sup> which are among the most relevant neuropeptides involved in feeding behavior.

Correspondence to: Susana Isabel Sá, Faculty of Medicine, Department of Anatomy, University of Porto, Alameda Professor Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal. Email: sasusana@med.up.pt

NPY is a 36 amino acid highly orexigenic neuropeptide that promotes food intake and inhibits energy expenditure.<sup>17–19</sup> Its effects are counter-regulated by the anorexigenic peptide  $\alpha$ -MSH, which is a pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptide<sup>20,21</sup> that inhibits food intake and induces energy expenditure.<sup>17,22</sup>

It has been shown that ARN neurons abundantly express estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ )<sup>23,24</sup> that co-localizes with NPY and POMC.<sup>25,26</sup> Estradiol action through ER $\alpha$  regulates the expression of neuropeptides that affect food intake, body weight, and adiposity.<sup>27,28</sup> Specifically, *in situ* hybridization studies of the ARN have shown that the expression of NPY mRNA increases at proestrus, and decreases at estrous<sup>29</sup> and after estradiol administration to ovariectomized rats.<sup>12,30,31</sup> In addition, ovariectomy was shown to decrease and estradiol administration to increase POMC mRNA expression in the ARN.<sup>26</sup> Because  $\alpha$ -MSH is a POMC-cleaved peptide that is a major regulator of energy balance, it is possible that estradiol will also regulate the expression of this neuropeptide.<sup>22,32</sup> To our knowledge, the only study that has addressed this subject showed that the  $\alpha$ -MSH levels are increased in ovariectomized rats treated with estradiol.<sup>33</sup>

The main goal of this study was to understand the consequences of the phasic inhibitory effect of estradiol on the expression of ARN neuropeptides that are known to be involved in the tonic regulation of food intake. In this way, we applied a modified model of acute estradiol replacement to ovariectomized rats<sup>7,34</sup> that has been widely used to study the phasic inhibitory effect of estradiol.<sup>30,31,34</sup> Previous reports on this subject are confined to NPY mRNA or protein expression levels and levels of NPY delivered to the PVN by ARN efferents in experimental models of cyclic estradiol administration.<sup>17–19</sup> In addition, until now, no studies have addressed the influence of estradiol on the expression of  $\alpha$ -MSH. In this study, we used stereological methods to estimate the total number of neurons that express NPY and  $\alpha$ -MSH in the ARN of young adult ovariectomized rats injected with oil or 17  $\beta$ -estradiol benzoate (EB). The effects of cyclic modulation of estradiol on body weights and food intake were also evaluated.

## Material and methods

### Animals and treatments

Female Wistar rats, obtained from the Institute for Molecular and Cell Biology (Porto, Portugal), were kept in a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h), with ambient temperature of 22 °C and humidity of 50%. Solid diet (4RF21/C Mucedola, Milan, Italy) and water were freely available throughout the experiment. Starting at 8 weeks of age, estrous cycles were monitored daily by vaginal smear cytology. Only females exhibiting consecutive 4 to 5 days estrous cycles were used. At 10 weeks of age, rats were anesthetized by sequential injections of promethazine (10 mg/kg body weight, subcutaneous; Laboratórios

Vitória, Amadora, Portugal), xylazine (2.6 mg/kg body weight, intramuscular; Sigma–Aldrich Ltd., Madrid, Spain), ketamine (50 mg/kg body weight, intramuscular; Merial Portuguesa, Rio de Mouro, Portugal), bilaterally ovariectomized, and allowed a 10-day recovery period. Because there is evidence that rearing in social isolation induces endocrine, physiological, and behavioral changes,<sup>35,36</sup> the rats were housed two per cage according to their weight. Ovariectomized rats ( $n = 6$  per group) were injected subcutaneously with either 10  $\mu$ g of EB in 100- $\mu$ l sesame oil (EB group), once in a 4-day cycle over four consecutive treatment cycles, or with 100- $\mu$ l sesame oil (Oil group).

In order to evaluate if the effects of EB on NPY and  $\alpha$ -MSH levels result from its direct influence on neuropeptide synthesis, rats received an intracerebroventricular injection of colchicine 6 days after the last cyclic administration of EB. Because previous studies have shown that colchicine is needed to stain NPY and  $\alpha$ -MSH neuronal cell bodies<sup>37–39</sup> and that colchicine was shown to affect RNA expression but not protein synthesis,<sup>39,40</sup> colchicine was used to inhibit axonal transport and to increase NPY and  $\alpha$ -MSH immunoreactivity in ARN cell bodies. Accordingly, rats were placed on a stereotaxic apparatus with the bregma and lambda in the same horizontal plane. After a midline skin incision, the calvaria were exposed and a hole was drilled unilaterally, 1.1 mm posterior to the bregma and 1.7 mm lateral to the midline.<sup>41</sup> A 10- $\mu$ l Hamilton syringe (901 N; Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland) was lowered into the right lateral ventricle until 5.2 mm from the surface of the skull. A solution of colchicine (50 nmol/ $\mu$ l, pH 7.4) in 0.25% physiological saline was injected gradually (2  $\mu$ l every 2 min) until the total amount of 10  $\mu$ l. The needle was left in place for an additional 10 min before being slowly withdrawn. Skin incisions were closed with surgical stitches and treated with local antiseptic. After surgery, rats were individually housed and maintained in a warm place until waking up. Postoperative care consisted of a subcutaneous injection of 5% carprofen (80  $\mu$ l/kg) in 0.9% saline (2 ml). EB and sesame oil were purchased from Sigma–Aldrich Company Ltd. (Madrid, Spain).

Body weights and food and water intake were assessed every day, starting at 8 weeks of age. Because rats were housed two per cage, consumption determinations were done on the basis of the amount of food consumed in each cage ( $n = 3$ ). The experiments were performed according to the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and the Portuguese Act No 113/13. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### Tissue preparation

Forty-eight hours after the infusion with colchicine and injection with either EB or oil, rats were anesthetized by intraperitoneal injection (3 ml/kg body weight) of a



solution containing 1% sodium pentobarbital in physiological saline. Then, they were perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6), for vascular rinse, followed by a fixative solution containing 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.6). The brains were removed from the skulls, weighed, immersed for 2 h in the same fixative, and maintained overnight in a solution of 10% sucrose in phosphate buffer, at 4 °C. After trimming away the frontal and occipital poles, the blocks of tissue containing both hemispheres were mounted on a vibratome and serially sectioned in the coronal plane through the ARN, at 40  $\mu$ m. After random selection of the first section between the first two most rostral ones, alternate sections were collected in phosphate buffered saline (PBS) in order to obtain two independent sets of sections from each brain: one set was used for NPY immunostaining and the other for  $\alpha$ -MSH immunostaining.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical procedures were performed as previously described.<sup>42</sup> Briefly, sections were treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min to inactivate endogenous peroxidase. To increase tissue penetration, triton X-100 was added to the PBS (0.5%) used in all immunoreactions and washes. For detection of NPY-immunoreactive (NPY-ir) neurons, sections were incubated, overnight at 4 °C, with the primary antiserum against NPY (T-4070, Bachem Ltd., San Carlos, CA, USA) at a dilution of 1 : 10000 and, then, with a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), at a dilution of 1 : 400, for 1 h at room temperature. For visualization of  $\alpha$ -MSH-ir neurons, sections were incubated, for 72 h at 4 °C, with the primary antiserum against  $\alpha$ -MSH (AB5087, Millipore Iberica, Madrid, Spain) at a dilution of 1 : 10000, followed by biotinylated rabbit anti-sheep secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at a dilution of 1 : 400, for 1 h at room temperature. Afterwards, sections were treated with the avidin–biotin peroxidase complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at a dilution of 1 : 800, for 1 h at room temperature, and incubated for 3 min (for NPY) or 90 s (for  $\alpha$ -MSH) in 0.05% diaminobenzidine (Sigma–Aldrich Ltd., Madrid, Spain) to which H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to a final concentration of 0.01%. Immunostained sections were mounted on gelatin-coated slides, air-dried, dehydrated, cleared in xylol, and cover-slipped using Histomount (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA). To prevent variability in staining, sections from all groups analyzed were processed in parallel at the same time. The same procedure was followed for control sections, which were incubated without antiserum or with each primary antibody previously inhibited by adsorption with the respective purified antigen; no immunostaining was observed in these sections.

### Estimation of the total number of NPY-ir and $\alpha$ -MSH-ir ARN neurons

The total number of NPY-ir and  $\alpha$ -MSH-ir ARN neurons was estimated by applying the optical fractionator method.<sup>43,44</sup> For this purpose, sections were analyzed using a modified Olympus BH-2 microscope interfaced with a color video camera and equipped with a Heidenhain ND 281 microcator (Tausreut, Germany), a computerized stage, and an object rotator (Olympus, Albertslund, Denmark). A computer fitted with a framegrabber (Screen Machine II, FAST Multimedia, Germany) was connected to the monitor. Using the C.A.S.T. – Grid system software (Olympus), the fields of view were systematically sampled in each section at regular intervals of either 100  $\mu$ m along the x axis and 160  $\mu$ m along the y axis (NPY-ir sections), or at regular intervals of 140  $\mu$ m along the x axis and 160  $\mu$ m along the y axis ( $\alpha$ -MSH-ir sections). The dissector used had a counting frame area at the tissue level of 2964  $\mu$ m<sup>2</sup> (NPY-ir sections) or 4447  $\mu$ m<sup>2</sup> ( $\alpha$ -MSH-ir sections) and the height of the dissector was 10  $\mu$ m for both neuronal populations. The estimations were performed with a  $\times$ 100 oil immersion lens with a numerical aperture of 1.40, at a final magnification of 2000 $\times$  in the computer screen. A cell profile was considered immunoreactive for NPY (Fig. 1(A)) and for  $\alpha$ -MSH (Fig. 1(B)) if a dark brown reaction product was present within the cell's perikaryal cytoplasm with a relatively unstained nucleus. On average, 198 NPY-ir and 191  $\alpha$ -MSH-ir neurons were counted per ARN; the mean coefficient of error<sup>45</sup> of the estimates was 0.08. The estimations were performed on both hemispheres and the data were pooled for each animal. All counts were made by an observer who was blind to the group assignment.

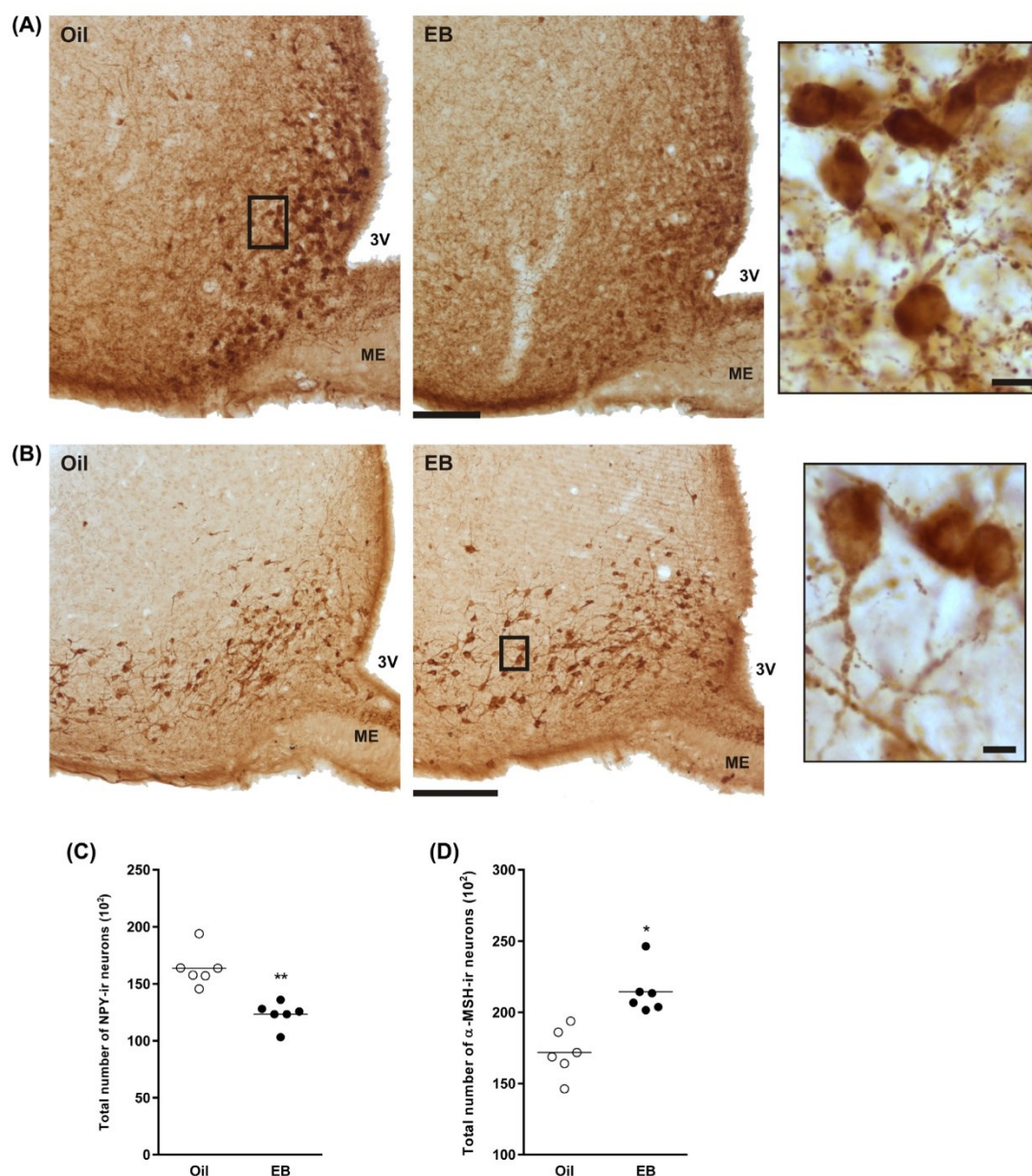
### Statistical analyses

The effects of treatment on food consumption and on body weights were assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures, using treatment as the independent variable and length of the experiment as repeated measures. Pairwise comparisons between oil- and EB-treated rats were made using the *post hoc* Sidak's multiple comparisons, while pairwise comparisons at different moments along the experiment were done with the Tukey's test (GRAPHPAD PRISM version 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The effect of treatment on the total number of NPY-ir and of  $\alpha$ -MSH-ir neurons was assessed by a student's *t*-test for independent samples. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .

## Results

### Food intake

As revealed by two-way repeated measures ANOVA, the amount of solid diet consumed (Fig. 2(A)) was influenced by treatment [ $F(1,24)=95.22, p < 0.0005$ ] and by the length

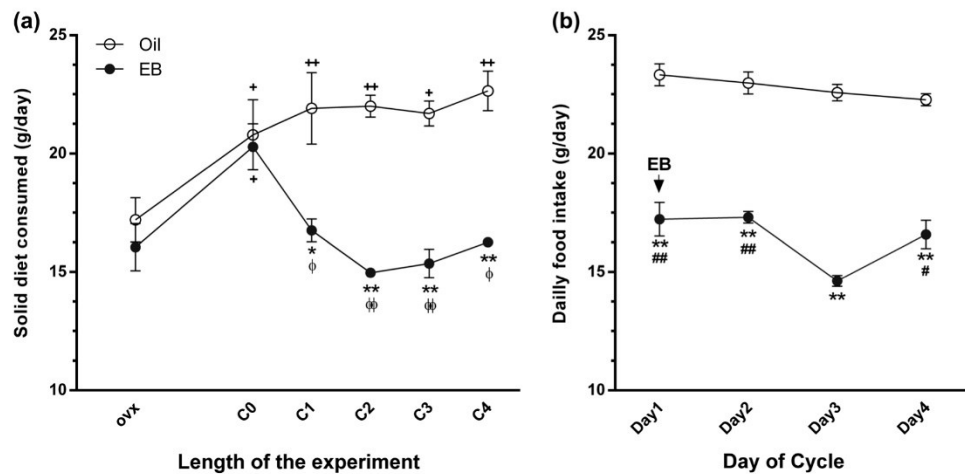


**Figure 1** Effect of EB administration on the expression of NPY and  $\alpha$ -MSH in the ARN. (A) Photomicrographs of coronal sections taken at mid-levels of the ARN of oil- or EB-treated rats, showing a reduced cell density in the EB group. 3 V, third ventricle. Scale bar = 100  $\mu$ m. Inset: Higher magnification of the area delineated by a box. Neurons immunoreactive for NPY are medium-sized, with a dark brown reaction product within the cell's perikaryal cytoplasm with a relatively unstained nucleus. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Photomicrographs of coronal sections taken at mid-levels of the ARN of oil- or EB-treated rats, showing a reduced cell density in the oil group. 3 V, third ventricle. Scale bar = 100  $\mu$ m. Inset: Higher magnification of the area delineated by a box. Neurons immunoreactive for NPY are medium-sized, with a dark brown reaction product within the cell's perikaryal cytoplasm with a relatively unstained nucleus. Scale bar = 10  $\mu$ m. (C) Graphic representation of the total number of NPY-ir neurons in the ARN of rats treated with oil or EB. Columns represent means and the vertical bars 1 SD. Student's *t*-test:  $*p < 0.005$ . (D) Graphic representation of the total number of  $\alpha$ -MSH-ir neurons in the ARN of rats treated with oil or EB. Columns represent means and the vertical bars 1 SD. Student's *t*-test:  $*p < 0.01$

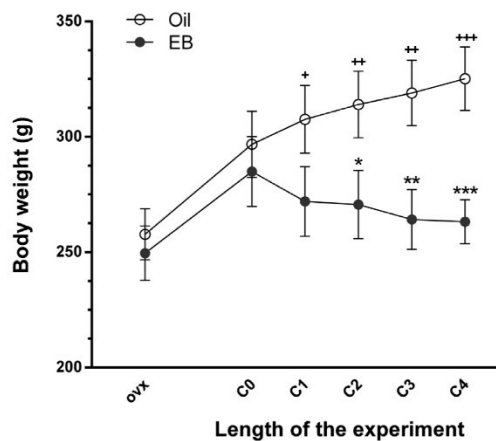
of the experiment [ $F(5,24)=5.59, p < 0.005$ ]. A significant interaction between treatment and length of the experiment was also detected [ $F(5,24)=6.63, p < 0.005$ ]. Two weeks after ovariectomy (C0), food consumption was 20% higher than at the time of ovariectomy. EB administration

along the four cycles of treatment was associated with a significant decrease in the amount of food consumed. During the four cycles of EB administration, the amount of food ingested by EB-treated rats was 30% lower than that consumed by oil-treated rats. In each cycle treatment,





**Figure 2** Graphic representation of the effect of EB administration on the amount of solid diet consumed by ovariectomized rats. (a) Estradiol effect along the entire treatment schedule: day of ovariectomy; (C0) beginning of the treatment; and (C1–C4) estradiol-induced cycles. Symbols represent means and the vertical bars 1 SD. (b) Effect of estradiol-induced cyclicity on the amount of solid diet consumed in each day of the 4-day cycles. Arrow identifies the day of EB administration. Symbols represent means of the four cycles and the vertical bars 1 SD. Sidak's multiple comparisons test: \*\* $p < 0.0005$ , \* $p < 0.005$  compared with oil group. Tukey's multiple comparisons test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  compared with the OVX time point of the same treatment group;  $\phi p < 0.05$ ,  $\phi\phi p < 0.005$  compared with C0 of the same treatment group; \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.0005$  compared with Day 3



**Figure 3** Graphic representation of the effect of EB administration on the body weight of ovariectomized rats along the entire treatment schedule: day of ovariectomy; (C0) beginning of the treatment; and (C1–C4) estradiol-induced cycles. Symbols represent means and the vertical bars SD. Sidak's multiple comparisons test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$  compared with oil group. Tukey's multiple comparisons test: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0005$  compared with values at OVX

there was a 15% decrease in the amount of food ingested at 48 h after EB administration that returned to basal values thereafter (Fig. 2(B)).

#### Body and brain weights

Two-way repeated measures ANOVA revealed significant effects of treatment [ $F(1,60)=35.12$ ,  $p < 0.0005$ ] and length of the experiment [ $F(5,60)=4.41$ ,  $p < 0.005$ ] on

body weights (Fig. 3). No significant interaction between treatment and length of the experiment was noted. From the day of ovariectomy until the end of the experiment, the EB group showed no changes in body weight while oil-treated rats increased their body weight by 25%. From the second to the fourth cycles of treatment, EB-treated rats were about 15% lighter than oil-treated rats (Fig. 3).

As revealed by the student's  $t$ -test, there were no differences in brain weights between oil- and EB-treated rats [ $p = 1.00$ ].

#### Effect of EB treatment on the total number of NPY-ir and $\alpha$ -MSH-ir neurons

EB administration induced a reduction of about 25% [ $p < 0.0005$ ] in the total number of NPY-ir neurons (Fig. 1(C)) and an increase of about 25% [ $p < 0.005$ ] in the total number of neurons expressing  $\alpha$ -MSH (Fig. 1(D)).

#### Discussion

To understand the role played by estradiol in the regulation of energy balance, we have analyzed neuropeptide expression in the ARN using an experimental model of four-week cyclic EB administration to ovariectomized rats. This model of acute estradiol administration to ovariectomized rats was shown to be fundamental in the study of the phasic inhibitory effects of estradiol on food intake.<sup>7,30,31,34</sup> The use of a model of exogenous administration of estradiol to ovariectomized rats allows us to study the exclusive action of estradiol, circumventing the possible influence of other ovarian hormones<sup>7,9,46–48</sup> and the need to use a high number of animals, as in estrous cyclicity studies. Our results on body weights and food intake show that our model was well established because they

are in accordance with data from earlier studies that have used a similar model of cyclic estradiol administration.<sup>1,11</sup> In fact, EB administration was associated to a decrease in the amount of food ingested to the values seen at the day of ovariectomy, but induced no significant changes in body weights. Conversely, in oil-injected rats, there was an increase in the daily amount of food consumed, and consequently a sharp increase in body weights, that started after two weeks of ovariectomy and progressively increased until the end of the experiment.

It has been shown that, in the ARN, estradiol modulates feeding behavior by decreasing the levels of orexigenic and increasing the levels of anorexigenic peptides.<sup>7,12,26,29</sup> Data from the present study show, for the first time with stereological methods, that EB prompts a reduction in the total number of ARN neurons that express NPY and, in parallel, an increase in the total number of neurons that express  $\alpha$ -MSH. It is known that approximately 20% of NPY-ir neurons in the ARN accumulate estradiol<sup>25</sup> and that the ER $\alpha$  subtype, whose activation inhibits NPY secretion,<sup>49</sup> is predominantly related with NPY role in hypothalamic feeding circuits.<sup>50</sup> It is also a fact that the increase in NPY levels in the ARN after the estradiol decline, occurring after ovariectomy or at menopause, is correlated with an increase in food consumption and in body weight gain.<sup>12,30</sup>

Upon EB administration, the total number of NPY-ir neurons in the ARN was reduced by 25%, which shows that the expression of NPY was rapidly and completely inhibited by EB in approximately 4000 neurons. Because prior to the last EB administration rats were injected with colchicine, which blocks the intracellular transport of NPY, the EB-induced decrease in the number of ARN neurons expressing NPY can only be ascribed to an inhibition of protein synthesis and not to an increase in the neuronal release of NPY. There is evidence that ER activation increases POMC expression in the ARN and promotes its posttranslational conversion to  $\alpha$ -MSH and ACTH.<sup>14,26,51</sup> Nevertheless, to our knowledge, only one study has addressed the effects of estradiol on the levels of  $\alpha$ -MSH in the ARN, not differentiating between increased synthesis or release.<sup>33</sup> Our data further extends these findings by confirming the suggested increase in  $\alpha$ -MSH synthesis and giving support to the role played by  $\alpha$ -MSH in the anorectic effect of EB.

The mechanisms by which estradiol affects the expression of NPY and  $\alpha$ -MSH in the ARN are still unknown, but data from the present and earlier studies<sup>32,51</sup> support a dynamic, reciprocal regulation of NPY and  $\alpha$ -MSH. There is evidence that, in the ARN, approximately 40% of NPY-ir neurons also express the  $\alpha$ -MSH receptor melanocortin-3, which enables direct modulation of NPY expression by  $\alpha$ -MSH activation of these receptors.<sup>17,51</sup> Inversely, NPY modulates  $\alpha$ -MSH expression in the ARN by inhibiting the posttranslational conversion of POMC to  $\alpha$ -MSH.<sup>17,32</sup> It remains to be elucidated which ARN neurons co-express both neuropeptides and if the same neuron is able to express

NPY and  $\alpha$ -MSH simultaneously or successively, a matter that is not addressed in the present study. Nevertheless, all evidences point to the existence of a direct, cyclic interaction between both peptides, in such a way that an increase in the expression of  $\alpha$ -MSH directly inhibits NPY synthesis, in the same or in different neurons, thereby inducing the reduction of food intake. Conversely, an increase in NPY expression directly inhibits  $\alpha$ -MSH expression and, consequently, increases food intake. However, in the ARN, NPY and POMC neurons also express ERs,<sup>25,26</sup> suggesting that estradiol may directly regulate NPY and  $\alpha$ -MSH expression. It is well recognized that leptin is able to inhibit NPY expression and activate POMC neurons,<sup>2,3</sup> turning leptin into a good candidate for the regulation of food intake.<sup>2,3,52</sup> Upon ovariectomy, there is a decrease in leptin receptor expression in the ARN, which renders the neurons unresponsive to the rise of leptin levels induced by increased fat.<sup>2,3,52</sup> Estradiol administration has no effect in leptin secretion but restores the expression of leptin receptors and, consequently, leptin responsiveness in the ARN.<sup>2,3,52</sup> In addition, estradiol activation of ER $\alpha$  increases POMC expression through the same pathway used by leptin.<sup>52</sup> Therefore, estradiol regulation of food intake could be the result of a superimposed mechanism in the NPY/ $\alpha$ -MSH reciprocal regulation, acting either directly or indirectly through the modulation of leptin receptors, promoting fasting and preventing feeding. This effect of estradiol could synchronize feeding moments with specific endocrine stimulus and responses, adjusting the caloric uptake with the estrous phase.

In conclusion, our data demonstrate that EB modulates food intake and body weight and the expression of anorexigenic and orexigenic neuropeptides in the ARN. They also suggest that the effect of estradiol on neuropeptide expression might superimpose on the reciprocal NPY/ $\alpha$ -MSH central regulation of energy balance. Further studies are necessary to understand how these neuropeptides are influenced by estradiol, giving new perspectives on how to prevent the risk factors associated with menopause in women.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgments

We thank Dr. Acilino Freitas-Vieira for helpful comments on the manuscript. This work is part of the studies comprised in an academic PhD Thesis.

### Funding

This work was supported by National Funds through FCT — Fundação para a Ciência e a Tecnologia within the scope of the Strategic Project Centro de Morfologia Experimental (CME/FM/UP)-2011–2012 (PEstOE/SAU/UI0121/2011) and SFRH/BD/66941/2009.

## Notes on contributors

All authors had full access to all the data in the study and gave final approval for submission.

Elce C.C. Rebouças was principally responsible for data collection, was involved in data analysis and interpretation and wrote the first draft.

Sandra Leal contributed to the critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Susana I. Sá help designed the study, was involved in data analysis and interpretation, and revised the manuscript.

## ORCID

Sandra Leal  <http://orcid.org/0000-0002-6762-4534>

Susana I. Sá  <http://orcid.org/0000-0002-5078-980X>

## References

- Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361:1251–63.
- Sandoval D, Cota D, Seeley RJ. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:513–35.
- Shi H, Sorrell JE, Clegg DJ, Woods SC, Seeley RJ. The roles of leptin receptors on POMC neurons in the regulation of sex-specific energy homeostasis. *Physiol Behav*. 2010;100:165–72.
- Toth MJ, Sites CK, Eltabbakh GH, Poehlman ET. Effect of menopausal status on insulin-stimulated glucose disposal: comparison of middle-aged premenopausal and early postmenopausal women. *Diabetes Care*. 2000;23:801–6.
- Trémollières FA, Pouilles JM, Ribot CA. Relative influence of age and menopause on total and regional body composition changes in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175:1594–1600.
- Buffenstein R, Poppitt SD, McDewitt RM, Prentice AM. Food intake and the menstrual cycle: a retrospective analysis, with implications for appetite research. *Physiol Behav*. 1995;58:1067–77.
- Eckel LA. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol Behav*. 2011;104:517–24.
- Dye L, Blundell JE. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. *Hum Reprod*. 1997;12:1142–51.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley kJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, et al. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*. 2005;146:1650–73.
- Santollo J, Daniels D. Multiple estrogen receptor subtypes influence ingestive behavior in female rodents. *Physiol Behav*. 2015;152:431–437.
- Yu Z, Geary N, Corwin RL. Individual effects of estradiol and progesterone on food intake and body weight in ovariectomized binge rats. *Physiol Behav*. 2011;104:687–93.
- Silva LE, Castro M, Amaral FC, Antunes-Rodrigues J, Elias LL. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43:759–66.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Hayase M, Tsuji T, Imagawa K, et al. The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Letters*. 1997;224:149–52.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18:158–68.
- Dube MG, Xu B, Kalra PS, Sninsky CA, Kalra SP. Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats. *Brain Res*. 1999;816:38–46.
- Li C, Chen P, Smith MS. Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study. *Brain Res*. 2000;854:122–9.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443:289–95.
- Lin S, Boey D, Herzog H. NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides*. 2004;38:189–200.
- Vianna CR, Coppari R. A treasure trove of hypothalamic neurocircuits governing body weight homeostasis. *Endocrinology*. 2011;152:11–18.
- Ellacott KL, Cone RD. The central melanocortin system and the integration of short and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:395–08.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, et al. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*. 1997;46:2119–23.
- Meister B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*. 2007;92:263–71.
- Shughrue PJ, Komm B, Merchenthaler I. The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*. 1996;61:678–81.
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 1990;294:76–95.
- Sar M, Sahu A, Crowley WR, Kalra SP. Localization of neuropeptide-Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus. *Endocrinology*. 1990;127:2752–6.
- Hirosawa M, Minata M, Harada KH, Hitomi T, Krust A, Koizumi A. Ablation of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) prevents upregulation of POMC by leptin and insulin. *Bioch Biophys Res Commun*. 2008;371:320–3.
- Geary N, Asarian L, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinology*. 2001;142:4751–7.
- Roesch DM. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav*. 2006;87:39–44.
- Bauer-Dantoin AC, Urban JH, Levine JE. Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus is increased during preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology*. 1992;131:2953–8.
- Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, et al. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes*. 2007;56:1051–8.
- Santollo J, Eckel LA. Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. *Behav Brain Res*. 2008;191:173–7.
- Cyr NE, Toorie AM, Steger JS, Sochat MM, Hyner S, Perello M, et al. Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic  $\alpha$ -MSH and TRH. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304:E640–50.
- Medina F, Siddiqui A, Scimoneilli T, Fenske C, Wilson CA, Celis ME. The inter-relationship between gonadal steroids and POMC peptides, beta-endorphin and alpha-MSH, in the control of sexual behavior in the female rat. *Peptides*. 1998;19:1309–16.
- Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav*. 2002;42:461–71.
- Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, et al. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience*. 2000;100:749–68.
- Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Rêlo AL, Nanz-Bahr NI, Feldon J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Brain Res*. 2004;152:279–95.
- Boyer PA, Tremblau A, Leviel V, Arluison M. Effects of intranigral injections of colchicine on the expression of some neuropeptides in the rat forebrain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res Bull*. 1994;33:541–60.
- Maolood N, Meister B. Dynorphin in pro-opiomelanocortin neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience*. 2008;154:1121–31.
- Lucas N, Legrand R, Ouelaa W, Breton J, Ténoune N, Bole-Feysot C, et al. Effects of rabbit anti- $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) immunoglobulins on  $\alpha$ -MSH signaling related to food intake control. *Neuropeptides*. 2014;48:21–7.
- Parish DC, Rodríguez EM, Birkett SD, Pickering BT. Effects of small doses of colchicine on the components of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Cell Tissue Res*. 1981;220:809–27.
- Paxinos G, Watson C, editors. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego, CA: Academic Press; 1998.
- Pereira PA, Santos D, Neves J, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Nerve growth factor retrieves neuropeptide Y and cholinergic immunoreactivity in the nucleus accumbens of old rats. *Neurobiol Aging*. 2013;34:1988–95.
- Madeira MD, Andrade JP, Lieberman AR, Sousa N, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Chronic alcohol consumption and withdrawal do not induce cell death in the suprachiasmatic nucleus, but lead to irreversible depression of peptide immunoreactivity and mRNA levels. *J Neuroscience*. 1997;17:1302–19.

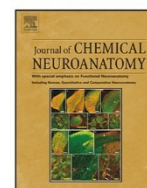
- 44 West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 1991;231:482–97.
- 45 Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology — reconsidered. *J Microsc.* 1999;193:199–11.
- 46 Wade GN. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1975;88:183–93.
- 47 Varma M, Chai JK, Meguid MM, Laviano A, Gleason JR, Yang ZJ, et al. Effect of estradiol and progesterone on daily rhythm in food intake and feeding patterns in fischer rats. *Physiol Behav.* 1999;68:99–107.
- 48 Gray JM, Wade GN. Food intake, body weight, and adiposity in female rats: actions and interactions of progestins and antiestrogens. *Am J Physiol.* 1981;240:E474–81.
- 49 Dhillon SS, Belsham DD. Estrogen inhibits NPY secretion through membrane-associated estrogen receptor (ER)- $\alpha$  in clonal, immortalized hypothalamic neurons. *Int J Obes (Lond).* 2011;35:198–07.
- 50 Titolo D, Cai F, Belsham DD. Coordinate regulation of neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression by estrogen depends on the ratio of estrogen receptor (ER)  $\alpha$  to ER $\beta$  in clonal hypothalamic neurons. *Mol Endocrinol.* 2006;20:2080–92.
- 51 Goazigo AR, Bodineau L, De Mota N, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, et al. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic  $\alpha$ -MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301:E955–66.
- 52 Larco DO, Cruthirds DF, Weiser MJ, Handa RJ, Wu TJ. The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. *Endocrine.* 2012;42:717–25.

***Changes in the female arcuate nucleus morphology and neurochemistry after chronic ethanol consumption and long-term withdrawal.***

Rebouças ECC, Leal S, Silva SM, Sa SI.

Journal of Chemical Neuroanatomy, 77:30-40, 2016.





# Changes in the female arcuate nucleus morphology and neurochemistry after chronic ethanol consumption and long-term withdrawal

Elce C.C. Rebouças<sup>a,b,c</sup>, Sandra Leal<sup>b,c,d</sup>, Susana M. Silva<sup>b,c</sup>, Susana I. Sá<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Natural Sciences, State University of Southwestern Bahia, Praça Primavera, 40-Bairro Primavera, Itapetinga, BA 45700-000, Brazil

<sup>b</sup> Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Porto, Al. Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

<sup>c</sup> Center for Health Technology and Services Research (CINTESIS), Faculty of Medicine, University of Porto, Rua Dr. Plácido da Costa, 4200-450 Porto, Portugal

<sup>d</sup> Institute of Research and Advanced Training in Health Sciences and Technologies (IINFATS), Department of Sciences, Instituto Universitário de Ciências da Saúde (IUCS), CESPU, CRL, R. Central da Gandra 1317, 4585-116 Gandra, Portugal

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 18 February 2016

Received in revised form 2 May 2016

Accepted 2 May 2016

Available online 3 May 2016

### Keywords:

Hypothalamic arcuate nucleus  
Heavy chronic ethanol treatment  
Long-term withdrawal  
Feeding-regulatory neuropeptides  
Estrogen receptor  
Tyrosine hydroxylase

## ABSTRACT

Ethanol is a macronutrient whose intake is a form of ingestive behavior, sharing physiological mechanisms with food intake. Chronic ethanol consumption is detrimental to the brain, inducing gender-dependent neuronal damage. The hypothalamic arcuate nucleus (ARN) is a modulator of food intake that expresses feeding-regulatory neuropeptides, such as alpha melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) and neuropeptide Y (NPY). Despite its involvement in pathways associated with eating disorders and ethanol abuse, the impact of ethanol consumption and withdrawal in the ARN structure and neurochemistry in females is unknown. We used female rat models of 20% ethanol consumption for six months and of subsequent ethanol withdrawal for two months. Food intake and body weights were measured. ARN morphology was stereologically analyzed to estimate its volume, total number of neurons and total number of neurons expressing NPY,  $\alpha$ -MSH, tyrosine hydroxylase (TH) and estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ). Ethanol decreased energy intake and body weights. However, it did not change the ARN morphology or the expression of NPY,  $\alpha$ -MSH and TH, while increasing ER $\alpha$  expression. Withdrawal induced a significant volume and neuron loss that was accompanied by an increase in NPY expression without affecting  $\alpha$ -MSH and TH expression. These findings indicate that the female ARN is more vulnerable to withdrawal than to excess alcohol. The data also support the hypothesis that the same pathways that regulate the expression of NPY and  $\alpha$ -MSH in long-term ethanol intake may regulate food intake. The present model of long-term ethanol intake and withdrawal induces new physiological conditions with adaptive responses.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Alcohol consumption is a worldwide health problem with serious socio-economic consequences. Research carried out in our laboratory and by others has considerably contributed for the now widely accepted view that chronic and excessive ethanol consumption disrupts the structure and the function of the central

nervous system (CNS) both in humans as in experimental animals (Harper, 2009; Mukherjee, 2013; Madeira and Paula-Barbosa, 1999; Silva et al., 2002a). Marked degenerative alterations, including cell and synapse loss, and changes in a variety of neurotransmitter systems have been noticed in numerous regions of the brain, including the hypothalamus (Harper, 2009; Madeira et al., 1993; Silva et al., 2002a; Tavares and Paula-Barbosa, 1984). Ethanol-induced malady may be either permanent (Silva et al., 2002a, 2009; Silva and Madeira, 2012) or reversible upon abstinence (Pereira et al., 2014; Silva et al., 2002b, 2009). Despite the evidence that ethanol-induced brain injury is sexually dimorphic, with females evidencing higher susceptibility for brain

\* Corresponding author at: Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Porto, Alameda Professor Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal.

E-mail addresses: [elcecrisina@gmail.com](mailto:elcecrisina@gmail.com) (E.C.C. Rebouças), [sleal@med.up.pt](mailto:sleal@med.up.pt) (S. Leal), [ssilva@med.up.pt](mailto:ssilva@med.up.pt) (S.M. Silva), [sasusana@med.up.pt](mailto:sasusana@med.up.pt) (S.I. Sá).

damage (Silva et al., 2009; Silva and Madeira, 2012; Sohrabji, 2002; Sullivan et al., 2002), few studies have addressed the effects of ethanol consumption on neurotransmitter systems in the female brain.

Accumulating evidence indicates that the regulation of ethanol consumption is controlled by the same hypothalamic peptides and brain circuits that regulate food intake (Egli, 2003; Thiele et al., 2003). The orexigenic neuropeptide Y (NPY) and the anorexigenic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) are widely known for their critical role in the regulation of feeding behavior (Morton et al., 2006; Meister, 2007; Vianna and Coppari, 2011). These neuropeptides were also shown to be involved in ethanol consumption and in the neurobiological responses to ethanol intake and withdrawal. In effect, NPY is involved with the neuronal mechanisms of alcohol preference (Caberlotto et al., 2001; Carvajal et al., 2006; Thiele et al., 2003) and in the modulation of alcohol withdrawal symptoms (Carvajal et al., 2006; Roy and Pandey, 2002).  $\alpha$ -MSH and melanocortin receptors have been implicated in the regulation of responses to ethanol consumption and withdrawal and in the modulation of the dopaminergic reward system (Olney et al., 2014; Shelkar et al., 2015; Thiele et al., 2003). Ethanol was also shown to disturb the dopaminergic system, increasing the craving effect of ethanol (Kim et al., 1997; Oomizu et al., 2003). The largest collection of hypothalamic neurons expressing NPY and  $\alpha$ -MSH are located in the arcuate nucleus (ARN) (Meister, 2007; Vianna and Coppari, 2011). This nucleus is one of the main central modulators of food intake (Bouret et al., 2004; Morton et al., 2006) and shares connections with other nuclei involved in the control of feeding behavior and ethanol consumption (Thiele et al., 2003; Valassi et al., 2008; Volkow et al., 2011). Moreover, ARN neurons release dopamine (Moore et al., 1987) and express dopamine receptors (Kim et al., 2010; Romero-Fernandez et al., 2014), whose activation decreases food intake and body weight (Guo et al., 2014; van de Giessen et al., 2014; Volkow et al., 2011).

Estradiol is the most relevant hormone affecting feeding behavior and body weight both in women (Racine et al., 2012) and female rats (Butera, 2010). This ovarian hormone exerts its actions through the activation of estrogen receptors (ER) (McEwen et al., 2012), which are abundantly expressed in the ARN (Chakraborty et al., 2003; Shughrue et al., 1996; Simerly et al., 1990) and co-localize with NPY, POMC and dopamine (de Souza et al., 2011; Leite et al., 2008; Sar et al., 1990). It has been shown that estradiol administration upon ovariectomy induces a decrease in NPY levels (Baskin et al., 1995; Shimizu et al., 1996; Silva et al., 2010) and an increase in POMC and  $\alpha$ -MSH expression in the ARN (de Souza et al., 2011; Hirosawa et al., 2008; Medina et al., 1998). Estradiol also affects the dopaminergic system (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001; DeMaria et al., 2000; Oomizu et al., 2003) and reduces the activity of tyrosine hydroxylase (TH) (Arbogast and Hyde, 2000; Jones and Naftolin, 1990).

Because central modulation of ethanol and food intake shares the same neuronal pathways, we sought to analyze the impact of heavy chronic ethanol consumption and long-term withdrawal in the structure and neurochemistry of the ARN. Knowing that estradiol, by acting through the ER $\alpha$ , can change the synthesis and expression of ARN neuropeptides, and that females are particularly susceptible to the deleterious effects of ethanol, we have also assessed the effect of ethanol and withdrawal in the expression of ER $\alpha$ . For this purpose, we have used stereological methods to estimate the volume of, and the total number of neurons in the ARN as well as the total number of ARN neurons expressing NPY,  $\alpha$ -MSH, TH and ER $\alpha$  in randomly cycling female rats upon six months of ethanol consumption or two months of withdrawal.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and treatments

Female Wistar rats were kept in a controlled room with 22 °C of temperature, 55% of humidity and under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7 a.m.). Solid diet (4RF21/C Mucedola, Milan, Italy) and water were freely available. Only females exhibiting consecutive 4- to 5-day estrous cycles were used. At 2 months of age, rats at all stages of the estrous cycle were randomly assigned to the ethanol-treated (Et) group, which had an alcoholic solution as the only liquid available, or the control group. The ethanol concentration was progressively increased in the course of 2 weeks, starting with a 5% (v/v) solution and rising by 1% per day to a final 20% (v/v). After 6 months of treatment, half of the Et rats were euthanized ( $n = 10$ ) and the remaining ( $n = 10$ ) were switched to tap water for a further 2 months – withdrawal (Wd) group. The shift from ethanol treatment to water intake was performed gradually over a 2-week period by progressively reducing the ethanol concentration in the drinking solution by 1% per day. The control group (isocaloric control, Ic,  $n = 10$ ) was isocaloric to the Et group. These rats had access to the same amount of food consumed by Et rats plus an additional quantity of pellets that was calculated taking into account the ethanol caloric value (1 gm = 7 Kcal) and the mean volume of ethanol solution consumed daily by Et rats (Madeira et al., 1997). All animals received beverage ad libitum and Et and Wd rats also received food ad libitum. The amount of solid and fluid intake was calculated daily and rats were weighed weekly. During the last 15 days of the experiments, the estrous cycle was monitored by daily collection of vaginal smears and histological examination. The experiments were performed according to the European Communities Council Directives of 22 September 2010 (2010/63/EU) and Portuguese Act n° 113/13. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### 2.2. Tissue preparation

#### 2.2.1. Histological procedures

Animals ( $n = 5$  per group) were anesthetized (3 ml/kg b.w. of a sodium pentobarbital solution, i.p.) and perfused transcardially, between 1 p.m. and 2 p.m., with a fixative solution containing 1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.12 M phosphate buffer (pH 7.2). The brains were removed from the skulls, weighed and post-fixed for 15 days in fresh fixative. After removal of the frontal and occipital poles, the blocks containing both the right and left hypothalami were dehydrated through a graded series of ethanol solutions, embedded in glycolmethacrylate (hydroxyethylmethacrylate, Technovit 7100, Kulzer and Co., Wehrheim, Germany) and sectioned in the coronal plane at 40  $\mu$ m. The sections were mounted serially and stained with a Giemsa solution (Fig. 1A) modified for use in glycolmethacrylate-embedded material (West et al., 1991). Finally, the sections were coverslipped with histomount mounting medium (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA). These sections were used for the estimation of total number of neurons and the volume of the ARN.

#### 2.2.2. Immunohistochemistry

Rats ( $n = 5$  per group) were anesthetized with promethazine (10 mg/kg bw, s.c.), xylazine (2.6 mg/kg bw, i.m.) and ketamine (50 mg/kg bw, i.m.) and stereotactically injected, into the lateral ventricle, with colchicine (10  $\mu$ l of a 0.25% solution in physiological saline; C9654, Sigma-Aldrich Ltd., Madrid, Spain). Because previous studies have shown that without the use of colchicine only NPY and  $\alpha$ -MSH fibers are stained (Boyer et al., 1994; Maalood and Meister, 2008; Lucas et al., 2014), colchicine was administered in order to inhibit axonal transport and to increase NPY and  $\alpha$ -MSH

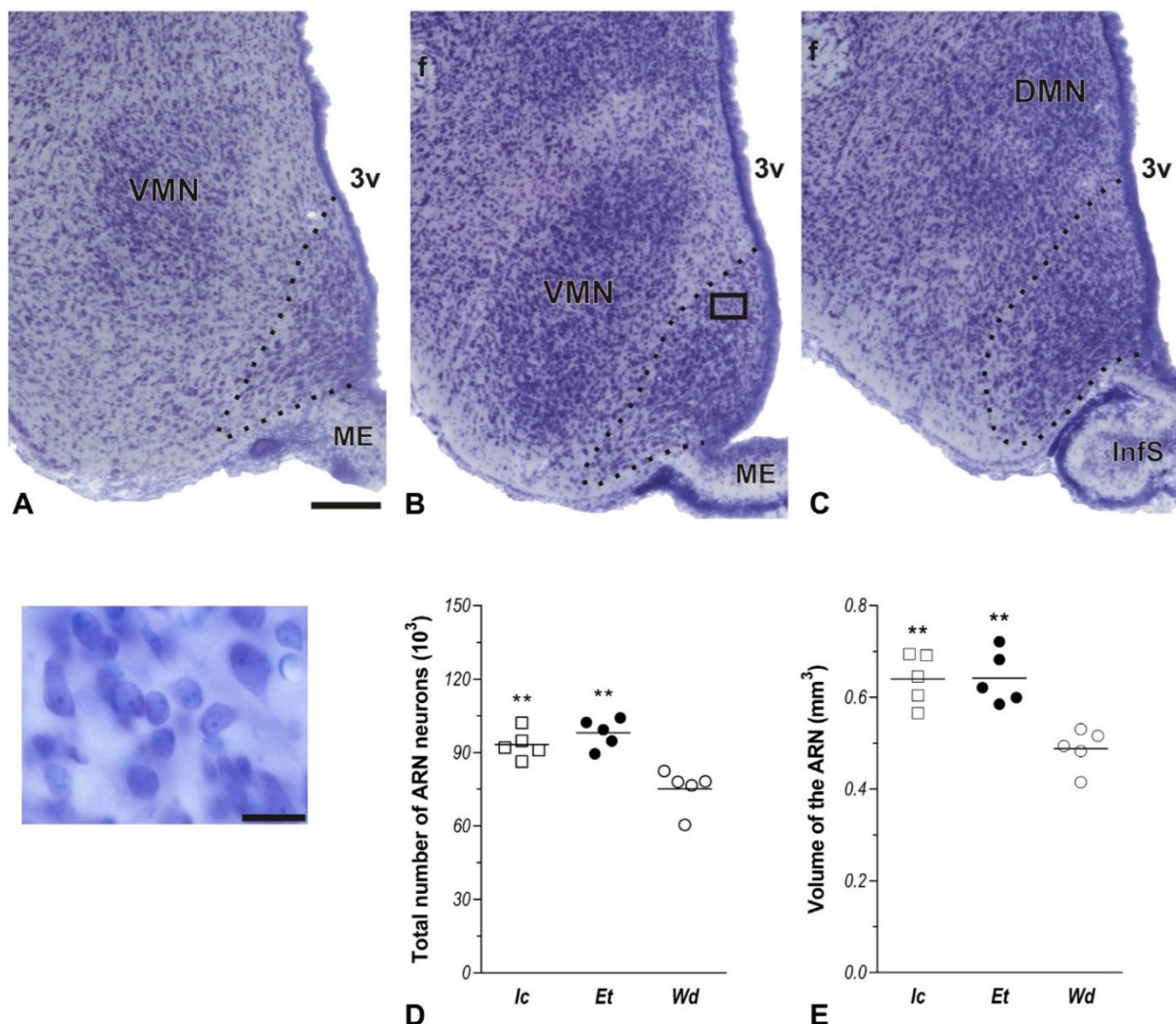


immunoreactivity in ARN cell bodies. Moreover, it was shown that colchicine might affect RNA expression but not protein synthesis (Parish et al., 1981; Lucas et al., 2014). After 48 h, the animals were anesthetized as described above and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.6). Brains were removed, immersed in the same fixative solution for 2 h, and maintained overnight in a solution of 10% sucrose in phosphate buffer. The blocks containing the right and left hypothalami were mounted on a Vibratome and serially sectioned at 40  $\mu\text{m}$  in the coronal plane. Sections were separately collected in phosphate-buffered saline (PBS). After random selection of the first section between the four most rostral sections thus obtained, one out of four sections were separately collected in PBS in order to obtain four independent sets from each brain. Each set was used for immunostaining of NPY,  $\alpha$ -MSH, ER $\alpha$  or TH. Sections were processed for immunohistochemistry using the avidin–biotin technique with diaminobenzidine as the chromogen, as previously described in detail (Pereira et al., 2013; Martins et al., 2015). Sections were incubated at 4°C with one of the following

antibodies: rabbit anti-NPY antibody (Cat#T-4070, RRID: AB\_518504, Bachem Ltd., San Carlos, CA, USA), 1:10,000, overnight (Fig. 2A); sheep anti- $\alpha$ -MSH antibody (Cat#: AB5087, RRID: AB\_91683, Milipore Iberica, Madrid, Spain), 1:10,000, for 72 h (Fig. 3A); mouse anti-TH antibody (Cat# T1299, RRID:AB\_477560, Sigma-Aldrich Ltd., Madrid, Spain); 1:150,000, overnight (Fig. 4A) and rabbit anti-ER $\alpha$  antibody (Cat# sc-542, RRID:AB\_631470, Santa Cruz Biotechnology, Germany), 1:1000, for 72 h (Fig. 5A). To minimize the variability in staining, sections from all groups analyzed were processed in parallel at the same time, for the same antibody. The same procedure was followed for control sections, which were incubated without antiserum; no immunostaining was observed in these sections (data not shown).

### 2.3. Stereological analyses

The stereological estimations were performed using a modified Olympus BH-2 microscope interfaced with a color video camera and equipped with a Heidenhain ND-281 microcator (Traunreut,

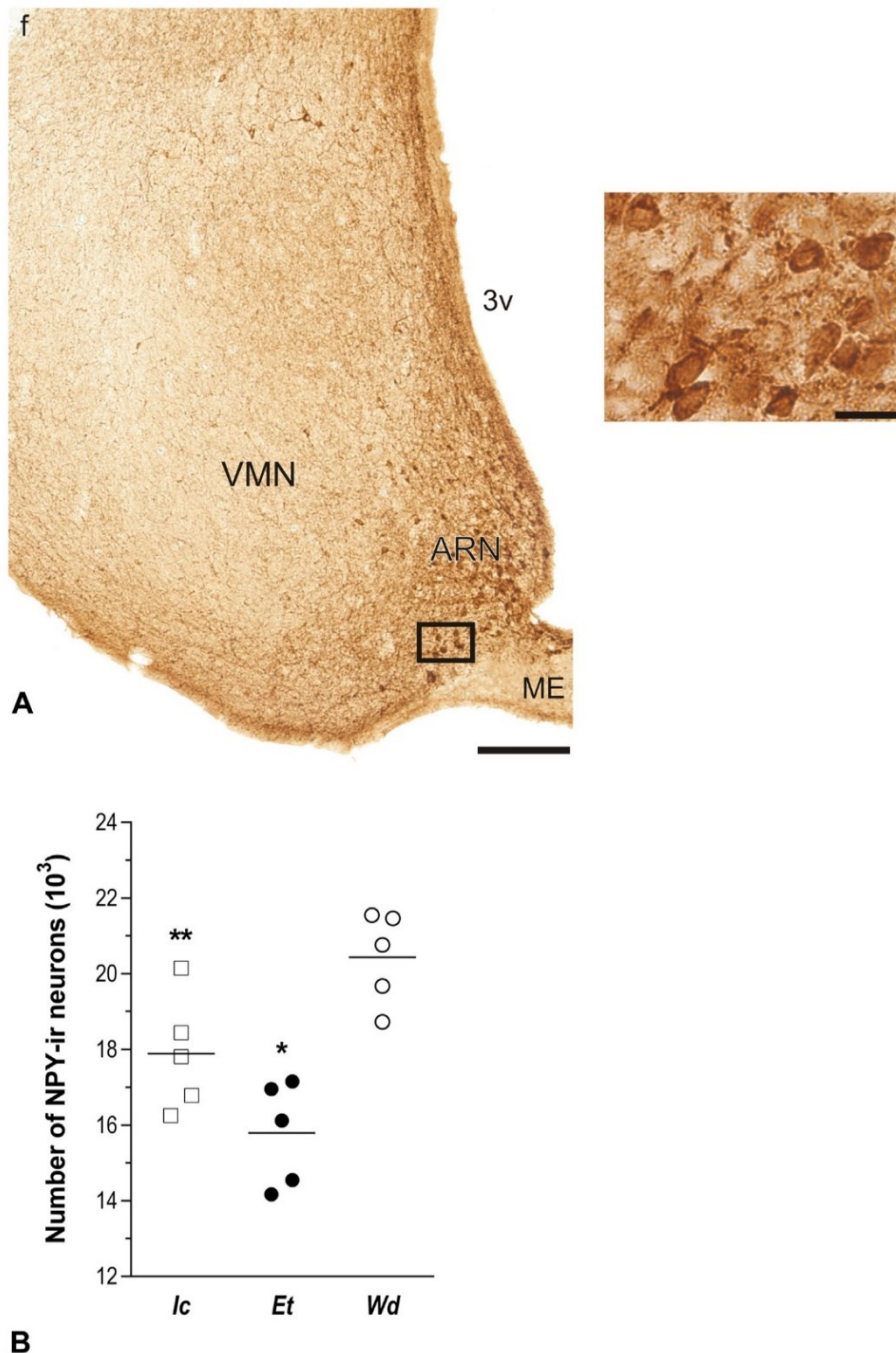


**Fig. 1.** Effects of ethanol consumption and withdrawal in the structure of the ARN. Photomicrographs of Giemsa-staining coronal sections taken at rostral- (A) mid- (B) and caudal-levels (C) of the ARN. The boundaries of the ARN are delineated with a dashed line. DMN, hypothalamic dorsomedial nucleus; VMN, hypothalamic ventromedial nucleus; InfS, infundibular stem; ME, median eminence; f, fornix; 3V, third ventricle. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ . Inset: Higher magnification of the area delineated by a box, showing ARN neurons in detail. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . (D) Graphic representation of the estimates of the total number of neurons in ARN of isocaloric control (Ic), ethanol-treated (Et) and withdrawn (Wd) rats. (E) Graphic representation of the volume of the ARN of Isocaloric control (Ic), Ethanol-treated (Et) and Withdrawn (Wd) rats. Lines represent means. Tukey's post hoc tests: \*\* $p < 0.005$  compared with Wd rats.



Germany), a computerized stage, and an object rotator (Olympus, Albertslund, Denmark). A computer fitted with a frame grabber (Screen Machine II, FAST Multimedia, Germany) was connected to the monitor. Estimations were all done by using a 100 $\times$  oil immersion lens with a numerical aperture of 1.40, at final magnification of 2000 $\times$  in the computer screen. The sections used for the estimation of the volume of the ARN and of its total number of neurons were selected, at regular intervals of 160  $\mu$ m,

from the entire set of coronal sections containing the ARN, by applying a systematic random sampling procedure (Gundersen and Jensen, 1987). Thence, every fourth section was systematically sampled, which provided an average of 13 sections per each nucleus. The sections were used for the estimation of the volume of, and total neuron numbers in the ARN. The boundaries of the ARN were delineated as described previously (Leal et al., 1998), based on the higher density, larger size and greater staining



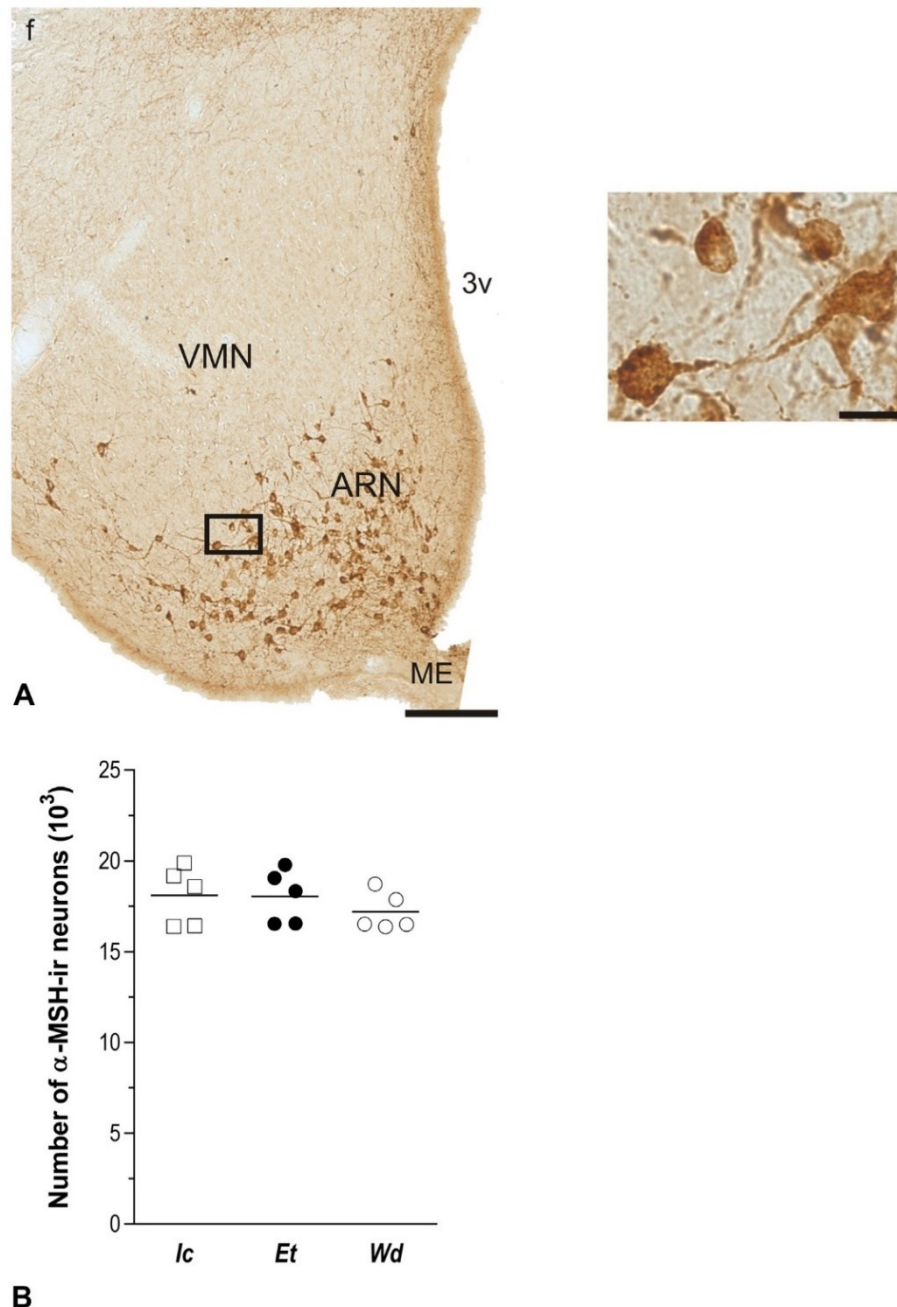
**Fig. 2.** Effects of ethanol consumption and withdrawal in the expression of NPY in the ARN. (A) Photomicrograph of a representative coronal section taken at mid-levels of the ARN immunostained for NPY. Specific immunostaining for NPY can be seen in the ARN. The hypothalamic ventromedial nucleus (VMN) exhibits no immunostaining for NPY. ME, median eminence; f, fornix; 3 V, third ventricle. Scale bar = 100  $\mu$ m. Inset: Higher magnification of the area delineated by a box, showing typical NPY-immunoreactive neurons. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Graphic representation of the total number of NPY-immunoreactive neurons in the ARN of isocaloric control (Ic), ethanol-treated (Et) and withdrawn (Wd) rats. Lines represent means. Tukey's post hoc tests: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  compared with Wd rats.

intensity of its neurons relative to those of the adjacent areas, which contain irregularly scattered small cells. The ARN is formed by bilateral well-circumscribed condensations of neurons that lie along the walls of the infundibular recess of the third ventricle in close apposition with the median eminence, at intermediate levels, or beneath the floor of the mammillary recess of the third ventricle, at caudal levels. The ARN is surrounded by a cell-poor zone that clearly demarcates it from the ventromedial nucleus and, further

caudally, from the dorsomedial nucleus that is located dorsally to the ARN.

### 2.3.1. Volume estimation

The volume of the ARN was estimated by using the Cavalieri estimator. The ARN profile was delineated (Fig. 1A) using an 4× objective lens and the cross-sectional area of the ARN was estimated by point counting (Gundersen et al., 1988; Leal et al., 1998), using a system of test points in which area per point,  $a(p)$ ,

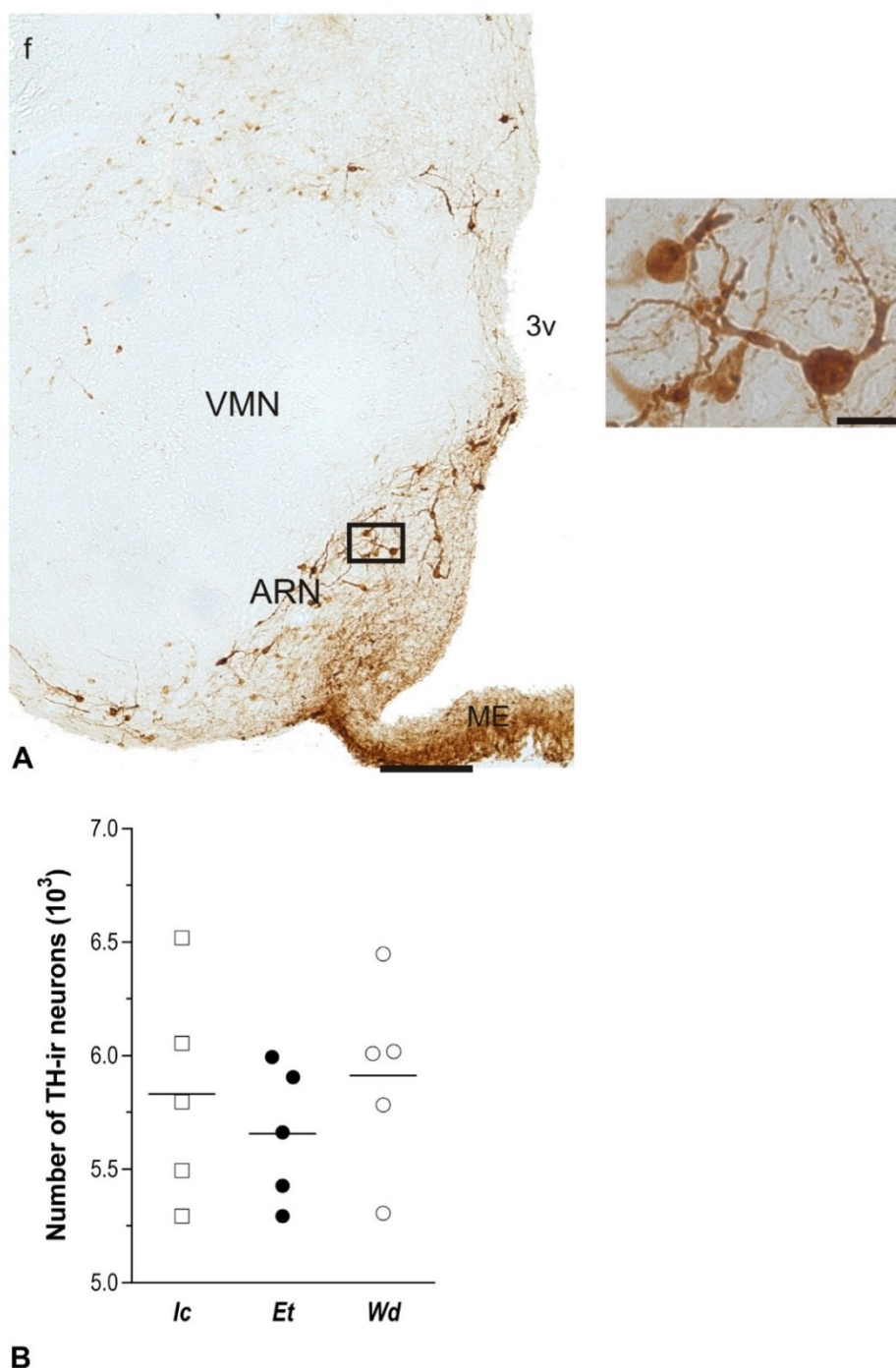


**Fig. 3.** Effects of ethanol consumption and withdrawal in the expression of  $\alpha$ -MSH in the ARN. (A) Photomicrograph of a representative coronal section taken at mid-levels of the ARN, immunostained for  $\alpha$ -MSH. Specific immunostaining for  $\alpha$ -MSH can be seen in the ARN. The hypothalamic ventromedial nucleus (VMN) exhibits no immunostaining for  $\alpha$ -MSH. ME, median eminence; f, fornix; 3 V, third ventricle. Scale bar = 100  $\mu$ m. Inset: Higher magnification of the area delineated by a box, showing typical  $\alpha$ -MSH-immunoreactive neurons. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Graphic representation of the total number of  $\alpha$ -MSH-immunoreactive neurons in the ARN of isocaloric control (Ic), ethanol-treated (Et) and withdrawn (Wd) rats. Lines represent means.

was 0.25 mm<sup>2</sup>. The mean (SD) tissue thickness of glycolmethacrylate-embedded sections was 29.7  $\mu$ m (0.5) in Ic, 29.3 (0.3) in Et and 30.6 (1.1) in Wd groups. The mean coefficient of error (CE) (Gundersen et al., 1999) of the individual estimates was 0.04.

### 2.3.2. Estimation of the total number of ARN neurons

The total number of neurons in the ARN was estimated by using the optical fractionator method (Leal et al., 1998; West et al., 1991) in the same sections used to estimate the ARN volume. In each section, the fields of view were systematically sampled using a step size of 120  $\mu$ m along the x axis and 180  $\mu$ m along the y axis, a



**Fig. 4.** Effects of ethanol consumption and withdrawal in the expression of TH in the ARN. (A) Photomicrograph of a representative coronal section taken at mid-levels of the ARN, immunostained for TH. Specific immunostaining for TH can be seen in the ARN. The hypothalamic ventromedial nucleus (VMN) exhibits no immunostaining for TH. ME, median eminence; f, fornix; 3 V, third ventricle. Scale bar = 100  $\mu$ m. Inset: Higher magnification of the area delineated by a box, showing typical TH-immunoreactive neurons. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Graphic representation of the total number TH-immunoreactive neurons in the ARN of isocaloric control (Ic), ethanol-treated (Et) and withdrawn (Wd) rats. Lines represent means.

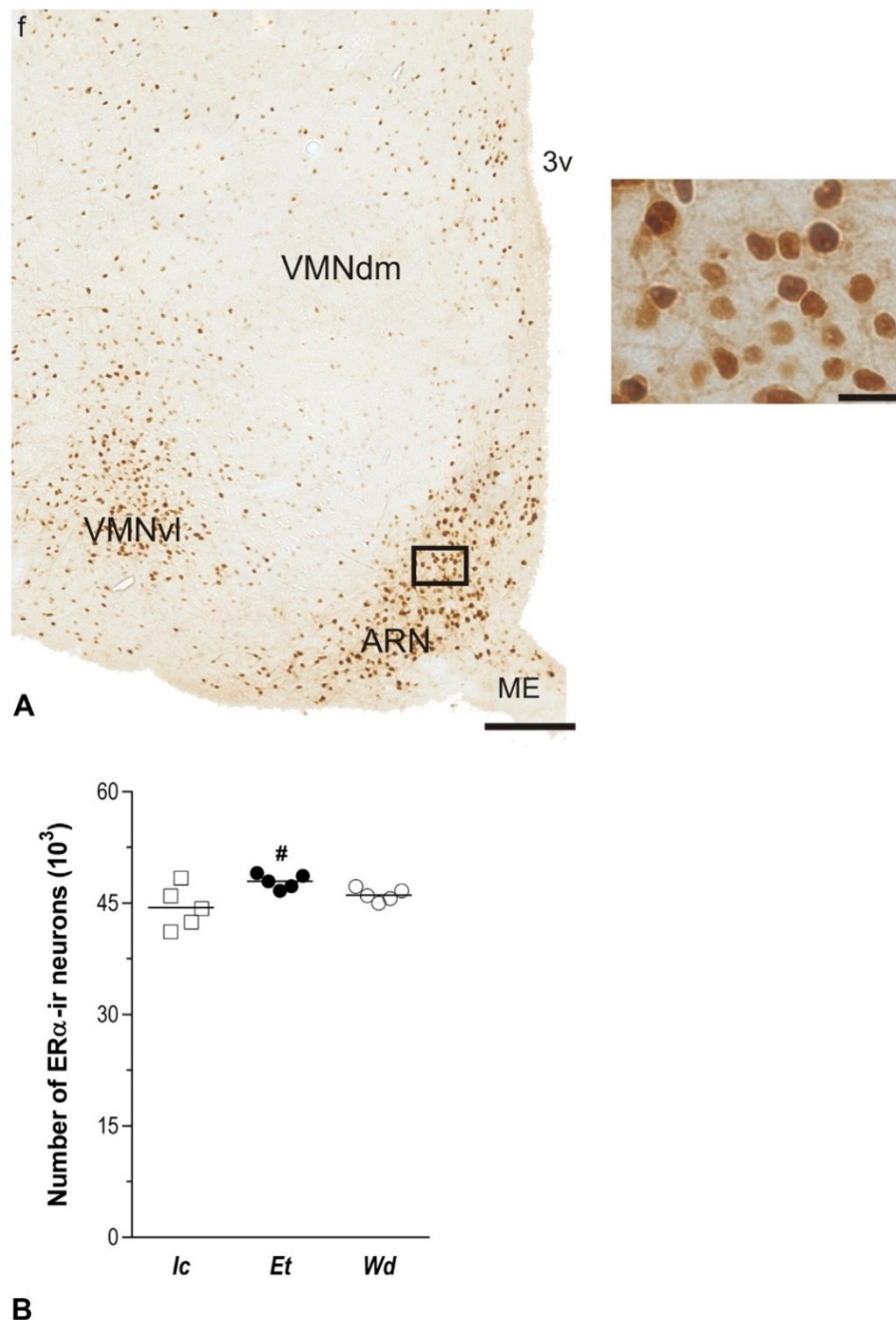


counting frame area of  $593 \mu\text{m}^2$  at the tissue level and a fixed height of  $15 \mu\text{m}$ . An average of 161 neurons was counted per nucleus. The mean CE of the estimates was 0.08. The nucleus as used as the counting unit, after positioning the look-up focal plane  $5 \mu\text{m}$  below the upper surface of the section. The disector height used was of  $10 \mu\text{m}$ , leaving a lower guard zone of approximately  $14 \mu\text{m}$ . In the present study, the tissue shrinkage factor of the glycolmethacrylate-embedded hypothalamic was not determined

because in previous estimations (Madeira and Paula-Barbosa, 1993; Madeira et al., 1995) it was founded to be negligible (about 4–5%).

### 2.3.3. Estimation of the total number of immunoreactive neurons

The total numbers of NPY-,  $\alpha$ -MSH-, TH- and ER $\alpha$ -immunoreactive (ir) neurons in the ARN were estimated by using the same stereological method. The interframe distances, the area of the



**Fig. 5.** Effects of ethanol consumption and withdrawal in the expression of ER $\alpha$  in the ARN. (A) Photomicrograph of a representative coronal section taken at mid-levels of the ARN, immunostained for ER $\alpha$ . Specific immunostaining for ER $\alpha$  can be seen in the ARN and the ventrolateral division of the hypothalamic ventromedial nucleus (VMNlv). The dorsomedial division of the hypothalamic ventromedial nucleus (VMNdm) exhibits no immunostaining for ER $\alpha$ . ME, median eminence; f, fornix; 3V, third ventricle. Scale bar =  $100 \mu\text{m}$ . Inset: Higher magnification of the area delineated by a box, showing typical ER $\alpha$ -immunoreactive neurons. Scale bar =  $10 \mu\text{m}$ . (B) Graphic representation of the total number of ER $\alpha$ -immunoreactive neurons in the ARN of isocaloric control (Ic), ethanol-treated (Et) and withdrawn (Wd) rats. Lines represent means. Tukey's post hoc tests: # $p < 0.05$  compared with Ic rats.

**Table 1**

Stereological parameters used for the estimation of the total number of ARN immunoreactive neurons.

	Interframe distance ( $\mu\text{m}$ )		Counting frame area ( $\mu\text{m}^2$ )	Disector height ( $\mu\text{m}$ )	Average cells counted	Estimate CE <sup>a</sup>
	x axis	y axis				
NPY	100	160	2964	10	198	0.08
$\alpha$ -MSH	140	160	4447	10	191	0.08
ER $\alpha$	120	180	988	10	193	0.09
TH	120	160	5929	10	157	0.09

<sup>a</sup> CE, mean coefficient of error of the estimates of total number of neurons, estimated using the formula:  $\sqrt{\text{meanCE}^2}$  (Gundersen et al., 1999).

counting frames, the height of the disector, the average number of immunostained neurons counted and the CE of the estimates is presented in Table 1. In the ARN, NPY-ir neurons are distributed along the in the ventromedial part (Meister, 2007). The  $\alpha$ -MSH-ir neurons are distributed along its ventrolateral part, while TH cell populations are along the ventrolateral and dorsomedial part of the ARN (Meister, 2007; Okamura et al., 1988). These neurons present an immunostained perikaryal cytoplasm with a relatively unstained nucleus (Figs. 2 A; 3 A; 4 A). The ER $\alpha$ -ir neurons are scattered along the ARN, but are separated from the neighbor nuclei by a cell free zone (Shughrue et al., 1998). These neurons present a dark brown reaction product within the cell nucleus (Fig. 5A). All the estimations were performed on both sides of the brain and the data were pooled for each animal. For each antibody, the average of sections analyzed per nucleus was 14. The mean (SD) tissue thickness of sections immunostained for NPY was 16.0  $\mu\text{m}$  (1.2) in Ic, 17.5 (0.9) in Et and 15.9 (0.7) in Wd groups, for  $\alpha$ -MSH was 17.1  $\mu\text{m}$  (0.8) in Ic, 18.1 (1.8) in Et and 17.6 (2.0) in Wd groups, for TH was 15.4  $\mu\text{m}$  (1.3) in Ic, 14.6 (1.5) in Et and 15.2 (1.4) in Wd groups and for ER $\alpha$  was 13.5  $\mu\text{m}$  (1.0) in Ic, 13.9 (0.4) in Et and 14.8 (1.2) in Wd groups. A z-axis distribution for NPY- (330 neurons),  $\alpha$ -MSH- (202 neurons), TH- (200 neurons) and ER $\alpha$ -ir (209 neurons) was done. It was observed that the majority of NPY- (75%),  $\alpha$ -MSH- (75%) and ER $\alpha$ -ir (84%) neurons were located between  $-3$  and  $-13 \mu\text{m}$  and that the majority of TH-ir neurons (84%) were located between  $-2$  and  $-12 \mu\text{m}$ . The disector used was of 10  $\mu\text{m}$  in order to allow a higher sampling number and was placed at 3  $\mu\text{m}$  (for NPY,  $\alpha$ -MDH and ER $\alpha$ ) or at 2  $\mu\text{m}$  (for TH) from the surface. The average nucleus diameter of ARN neurons was 9.2, 10.3, 8.9 and 7.5  $\mu\text{m}$  for NPY,  $\alpha$ -MSH, TH and ER $\alpha$ , respectively, which means that the disector position failed to obey the guard zone rule (Andersen and Gundersen, 1999). However, the placement of the counting frame was shown to induce less bias because it samples a higher number of neurons, displaced by the

substantial z-axis distortion of vibratome sections (Gardella et al., 2003).

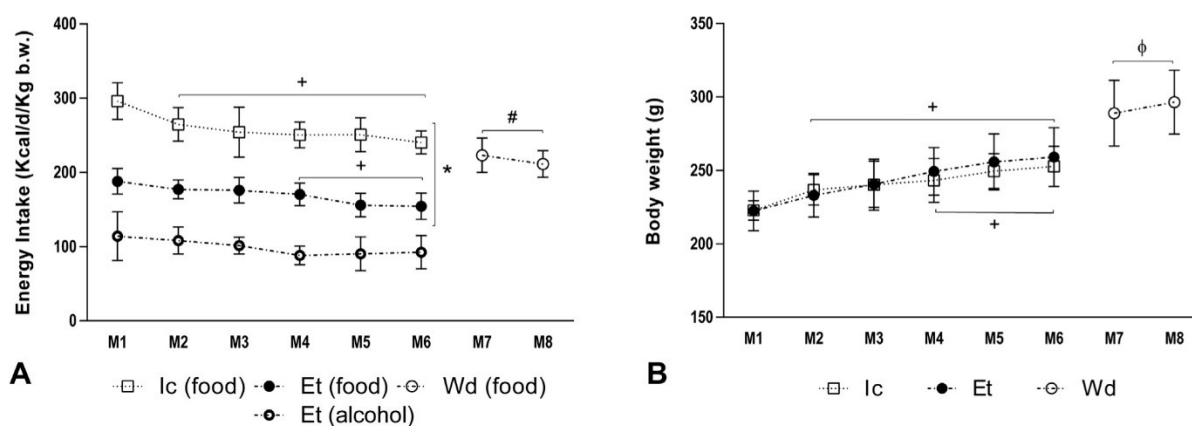
## 2.4. Statistical analyses

The effects of chronic heavy ethanol consumption and long-term withdrawal on the volume of the ARN, and the total number of ARN neurons and neurons expressing NPY,  $\alpha$ -MSH, TH and ER $\alpha$  in ARN neurons were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA). The effects of chronic heavy ethanol consumption and long-term withdrawal on body weight and food consumption were assessed by repeated measures two-way ANOVA. Whenever significant results were found from the overall ANOVA, pairwise comparisons were made with the post hoc Tukey's honest significant difference test. Differences were considered to be significant if  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Energy intake and body weight

As revealed by two-way repeated measures ANOVA, the energy intake (Fig. 6A) was influenced by treatment ( $F_{1,18} = 117.11$ ,  $p < 0.0001$ ) and by time ( $F_{7,126} = 38.66$ ,  $p < 0.0001$ ). A significant interaction between treatment and time of the experiment was detected ( $F_{7,126} = 34.67$ ,  $p < 0.0001$ ). In Et rats, energy intake from food was about 30–35% less than in the Ic group along the six-month period which was maintained at the end of the study (Fig. 6A). Wd rats showed a 25% increase in energy intake relative to Et rats (Fig. 6A). A two-way repeated measures ANOVA revealed a significant effect of treatment ( $F_{7,126} = 49.75$ ,  $p < 0.0001$ ) and time ( $F_{1,18} = 14.17$ ,  $p < 0.0001$ ) on body weight. A significant interaction between treatment and length of the experiment was detected ( $F_{7,126} = 7.31$ ,  $p < 0.0001$ ). The body weight of Ic and Et rats



**Fig. 6.** Graphic representation of the effects of ethanol treatment and withdrawal on energy intake (A) and body weight (B) of isocaloric control (Ic), ethanol-treated (Et) and withdrawn (Wd) rats. Symbols represent means and the vertical bars SD. Tukey's post hoc tests: <sup>+</sup> $p < 0.001$ , compared with M1 of the same treatment group; <sup>\*</sup> $p < 0.001$ , compared with Et group at M6; <sup>#</sup> $p < 0.001$  compared with Ic and Et groups at M1 to M6; <sup>φ</sup> $p < 0.05$  comparing Ic and Et groups at M1 to M6.

significantly increased from the first to the sixth month of the study but it did not differ from one-another along the entire study (Fig. 6B). Withdrawal was associated with a 16% increase in body weight relative to Ic and Et-treated rats at the end of the experiment.

### 3.2. ARN volume and total number of neurons

The volume and the total number of neurons in the ARN (Fig. 1B and C) were influenced by treatment ( $F_{2,12} = 13.86$ ,  $p < 0.005$ ;  $F_{2,12} = 15.37$ ,  $p < 0.005$ , respectively). Alcohol consumption did not induce changes in the volume nor in the total number of ARN neurons. However, withdrawal was associated with a reduction of 23% in the volume of the ARN and of 25% in the total number of ARN neurons, when compared Ic and Et rats.

### 3.3. Total number of immunoreactive ARN neurons

The total number of NPY-immunoreactive neurons in ARN was significantly influenced by treatment ( $F_{2,12} = 14.31$ ,  $p < 0.005$ ). In Wd rats, the total number of neurons that express NPY was 30% higher than in Et and 15% higher than in Ic rats (Fig. 2B). There was no influence of treatment on the total numbers of  $\alpha$ -MSH- (Fig. 3B) and TH-immunoreactive neurons in the ARN (Fig. 4B).

The total number of ER $\alpha$ -immunoreactive neurons in the ARN was significantly influenced by treatment ( $F_{2,12} = 4.64$ ,  $p < 0.05$ ). Ethanol consumption induced an increase of 8% in the total number of ARN neurons expressing ER $\alpha$  when compared with Ic rats. There were no differences in the total number of these neurons between Wd and Et or Ic rats (Fig. 5B).

## 4. Discussion

The present study provides new insights about the effects of chronic ethanol consumption and long-term withdrawal on the morphology and neurochemistry of the female ARN. Chronic ethanol consumption reduced energy intake and increased the total number of ARN neurons expressing ER $\alpha$ , but induced no changes in the morphology of the ARN or in the total number of NPY-,  $\alpha$ -MSH- and TH-immunoreactive neurons. Contrariwise, long-term withdrawal induced neuronal and volume loss in the ARN and increased the total number of neurons expressing NPY. Present data is in accordance with ours (Assunção et al., 2007; Carneiro et al., 2008; Silva et al., 2009) and with other previous studies (Kachani et al., 2008; Lieber, 1991; Thiele et al., 2003) as they show that chronic ethanol consumption reduces energy intake from food that is reverted upon withdrawal. Et rats had a total caloric intake equal to that of Ic rats while consuming less calories from food, which was available *ad libitum*, because the remaining calories were provided by ethanol. However, Et rats show lower body weights than Wd rats because the calories provide by ethanol are “empty” due to the lack of essential nutrients such as protein, lipids, vitamins and trace elements (Kachani et al., 2008; Lieber, 1991). Upon withdrawal, the contribution of empty calories from ethanol is replaced with calories from food, thus promoting a significant increase in body weight.

The results of this study show, for the first time and by using stereological methods, that heavy chronic ethanol consumption induces no structural damage in the ARN, namely in the total number of neurons nor in the volume. Previous studies that used the same experimental method in male rats have shown decreased volume and neuronal number in other areas of the CNS, such as the hippocampal formation and the medial septum/vertical limb of the diagonal band of Broca (Cadete-Leite et al., 2003; Paula-Barbosa et al., 1993). The divergences between these studies and the

present one could be ascribed to the sex of the animals or to brain region studied, which may present different susceptibility to the neurotoxicological effects of ethanol. In accordance with present results in the ARN, it was shown that chronic ethanol consumption has no effect on the suprachiasmatic nucleus (Madeira et al., 1997), which was associated with the known resistance of its neurons to kainic acid or glutamate (Ding et al., 1994; Meijer et al., 1993; Peterson and Moore, 1980). In fact, there is compelling evidence that ethanol-induced deleterious effects are mediated by neuronal excitotoxicity (De Witte, 2004; Lovinger, 1993) and that NPY and  $\alpha$ -MSH are potent neuroprotective agents against excitotoxicity (Baraban, 2004; Forslin Aronsson et al., 2007; Olney et al., 2014). Since the ARN expresses abundantly both NPY and  $\alpha$ -MSH, the absence of ethanol-induced neuronal loss in the ARN might be due to the protective effects of these peptides.

Our data also show that ethanol consumption has no effects on the expression of NPY and  $\alpha$ -MSH in the ARN. They also show that the ratio NPY/ $\alpha$ -MSH expressing neurons in the ARN was equivalent to the ratio reported in animals with low estradiol levels (Cyr et al., 2013; Morton et al., 2006). To our knowledge, this is the first time that the effects of ethanol consumption in the expression of ER $\alpha$  in the ARN of female rats were evaluated. The results show that chronic ethanol consumption induces a small, but significant increase in the total number of ARN neurons that express ER $\alpha$ . It was previously shown that the expression of ER $\alpha$  in the ARN is increased when the circulating estradiol is at basal levels (Funabashi et al., 2000; Yamada et al., 2009). In addition, ethanol consumption was shown to induce lengthening of the estrous cycle (Emanuele et al., 2001; Sanchis et al., 1985). Our results are in agreement with these findings as they show an increase in ER $\alpha$  expression in the Et group. Indeed, in our study rats were selected at random stages of the estrous cycle and, consequently, there is a high probability of a given rat to be studied at a stage of the estrous cycle with low estradiol levels. Ethanol consumption had no effect on the total number of TH-immunoreactive neurons, suggesting that the expression of dopamine in the ARN was not affected by long-term ethanol consumption, since TH is the rate-limiting enzyme of the dopamine catabolic pathway. It has been shown that ethanol increases dopamine release in regions involved in reward and addiction (Kim et al., 1997; Rasmussen et al., 2001). It is therefore possible that the lack of changes in the total number of TH-immunoreactive neurons found in our study may be related with the main role of dopamine in the ARN that is the inhibition in prolactin secretion by the pituitary gland (Freeman et al., 2000; Grattan and Kokay, 2008) and not with reward/addiction pathways. Furthermore, the fact that present results show no changes in the total number of TH-immunoreactive neurons in the ARN of Et and Wd rat does not exclude the possibility that the levels of TH may be altered.

Ethanol withdrawal is well known for the mitigation of ethanol-related diseases. However, the present study, as well as others, (Cadete-Leite et al., 2003; Paula-Barbosa et al., 1993; Pereira et al., 2014) gives support to the notion that protracted withdrawal upon chronic ethanol consumption has deleterious effects within the CNS. Indeed, the present data show that withdrawal reduced the volume and total neuron numbers in the ARN, suggesting that the withdrawal-induced structural damage could be a consequence of increased excitotoxicity (Bison and Crews, 2003; Ehlers et al., 1998). It was previously reported that there is a decrease in NPY levels in the ARN during the first 24 h of withdrawal, which is completely reversed one-week later (Bison and Crews, 2003; Ehlers et al., 1998). Our results further extend these observations by showing that, upon 2 months of withdrawal, there is actually an increase in the total number of NPY neurons in the ARN. The effect of long-term withdrawal in NPY expression was also shown in



other brain areas, strengthening the idea that an increase in NPY expression could be an adaptive mechanism to the increased excitotoxicity, protecting against neuronal damage (Baraban, 2004; Bison and Crews, 2003; Malva et al., 2012; Pereira et al., 2016). Contrariwise, and since it is well-known that increased feeding behavior affects NPY expression in the ARN, the increased body weight seen in Wd rats could be an alternative explanation to the increased NPY expression seen in that group. It is also plausible that the increased body weight of Wd rats could be related to changes in peripheral appetite-regulating peptides such as leptin. Despite the recognition that leptin has a relevant role in feeding behavior, most of the available studies have focused on the link between leptin levels and alcohol craving during withdrawal (Kiefer et al., 2001; Wurst et al., 2003). In addition, studies in humans have shown different results for acute alcohol withdrawal plasma leptin levels, being either high (Kiefer et al., 2001) or normal (Wurst et al., 2003).

It was expected that this effect would be accompanied by changes in  $\alpha$ -MSH expression, namely a decrease of its expression in the ARN. However, our results show that withdrawal is not associated with an increase in the total number of  $\alpha$ -MSH-immunoreactive neurons. Therefore, it is possible that withdrawal might trigger a new NPY/ $\alpha$ -MSH balance and that the lack of changes in the number of  $\alpha$ -MSH-immunoreactive neurons may be the response to the new counter-regulatory effect of NPY on  $\alpha$ -MSH. Similar to what happened in Et rats, we did not find changes in the total number of TH-immunoreactive neurons, suggesting that after long-term withdrawal dopamine levels may return to basal values in the ARN.

In conclusion, the present study shows that chronic ethanol consumption has no effect in the morphology or in the neurochemistry of the ARN of female rats, namely in the number of NPY,  $\alpha$ -MSH and TH expressing neurons. The absence of effects of chronic ethanol consumption and of isocaloric food intake on the ratio of NPY/ $\alpha$ -MSH expression in ARN, contributes to the notion of an overlapping feeding and ethanol consumption regulatory pathways. Contrariwise, long-term withdrawal leads to marked changes in the ARN structure and neurochemistry, such as neuronal and volume loss, and increased NPY expression. As in other brain areas, the deleterious effects of withdrawal in the ARN deserve further investigation.

## Acknowledgments

This work was supported by National Funds through FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia within the scope of the Strategic Project Centro de Morfologia Experimental UI 121-2014 (PEst-OE/SAU/UI0121/2014) and SFRH/BD/66941/2009. We thank M.Sc. Acilino Freitas-Vieira for his helpful comments on the manuscript. This work is part of the studies comprised in an academic PhD Thesis.

## References

- Andersen, B.B., Gundersen, H.J., 1999. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. *J. Microsc.* 196, 69–73.
- Arbogast, L.A., Hyde, J.F., 2000. Estradiol attenuates the forskolin-induced increase in hypothalamic tyrosine hydroxylase activity. *Neuroendocrinology* 71, 219–227.
- Assunção, M., de Freitas, V., Paula-Barbosa, M., 2007. Grape seed flavanols, but not Port wine, prevent ethanol-induced neuronal lipofuscin formation. *Brain Res.* 1129, 72–80.
- Baraban, S.C., 2004. Neuropeptide Y and epilepsy: recent progress, prospects and controversies. *Neuropeptides* 38, 261–265.
- Baskin, D.G., Norwood, B.J., Schwartz, M.W., Koerker, D.J., 1995. Estradiol inhibits the increase of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression induced by weight loss in ovariectomized rats. *Endocrinology* 136, 5547–5554.
- Ben-Jonathan, N., Hnasko, R., 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.* 22, 724–763.
- Bison, S., Crews, F., 2003. Alcohol withdrawal increases neuropeptide Y immunoreactivity in rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 27, 1173–1183.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B., 2004. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behaviour in mice. *J. Neurosci.* 24, 2797–2805.
- Boyer, P.A., Trembleau, A., Leviel, V., Arluison, M., 1994. Effects of intranigral injections of colchicine on the expression of some neuropeptides in the rat forebrain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res. Bull.* 33, 541–560.
- Butera, P.C., 2010. Estradiol and the control of food intake. *Physiol. Behav.* 99, 175–180.
- Caberlotto, L., Thorsell, A., Rimondini, R., Sommer, W., Hyytiä, P., Heilig, M., 2001. Differential expression of NPY and its receptors in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25, 1564–1569.
- Cadete-Leite, A., Pereira, P.A., Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M., 2003. Nerve growth factor prevents cell death and induces hypertrophy of basal forebrain cholinergic neurons in rats withdrawn from prolonged ethanol intake. *Neuroscience* 119, 1055–1069.
- Carneiro, A., Assunção, M., De Freitas, V., Paula-Barbosa, M.M., Andrade, J.P., 2008. Red wine, but not port wine, protects rat hippocampal dentate gyrus against ethanol-induced neuronal damage-relevance of the sugar content. *Alcohol* 43, 408–415.
- Carvajal, C., Dumont, Y., Quirion, R., 2006. Neuropeptide y: role in emotion and alcohol dependence. *CNS Neurol. Disord. -Drug Targets* 5, 181–195.
- Chakraborty, T.R., Hof, P.R., Ng, L., Gore, A.C., 2003. Stereologic analysis of estrogen receptor alpha (ER alpha) expression in rat hypothalamus and its regulation by aging and estrogen. *J. Comp. Neurol.* 466, 409–421.
- Cyr, N.E., Toorie, A.M., Steger, J.S., Sochat, M.M., Hyner, S., Perello, M., et al., 2013. Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic  $\alpha$ -MSH and TRH. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E640–E650.
- De Witte, P., 2004. Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol. *Addict. Behav.* 29, 1325–1339.
- DeMaria, J.E., Livingstone, J.D., Freeman, M.E., 2000. Ovarian steroids influence the activity of neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res.* 879, 139–147.
- de Souza, F.S., Nasif, S., López-Leal, R., Levi, D.H., Low, M.J., Rubinstein, M., 2011. The estrogen receptor  $\alpha$  colocalizes with proopiomelanocortin in hypothalamic neurons and binds to a conserved motif present in the neuron-specific enhancer nPE2. *Eur. J. Pharmacol.* 660, 181–187.
- Ding, J.M., Chen, D., Weber, E.T., Faiman, L.E., Rea, M.A., Gillette, M.U., 1994. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266, 1713–1717.
- Egli, M., 2003. Peptides: their role in excess alcohol drinking and their promise as a therapeutic tool. *Physiol. Behav.* 79, 89–93.
- Ehlers, C.L., Li, T.-K., Lumeng, L., Hwang, B.H., Sones, C., Jimenez, P., 1998. Neuropeptide Y levels in ethanol-naïve alcohol-preferring and nonpreferring rats and in Wistar rats after ethanol exposure. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22, 1778–1782.
- Emanuele, N.V., LaPaglia, N., Steiner, J., Kirsteins, L., Emanuele, M.A., 2001. Effect of chronic ethanol exposure on female rat reproductive cyclicity and hormone secretion. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25, 1025–1029.
- Forslin Aronsson, A., Spulber, S., Oprica, M., Winblad, B., Post, C., Schultzberg, M., 2007. Alpha-MSH rescues neurons from excitotoxic cell death. *J. Mol. Neurosci.* 33, 239–251.
- Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G., 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80, 1523–1631.
- Funabashi, T., Kleopoulos, S.P., Brooks, P.J., Kimura, F., Pfaff, D.W., Shinohara, K., et al., 2000. Changes in estrogenic regulation of estrogen receptor alpha mRNA and progesterone receptor mRNA in the female rat hypothalamus during aging: an in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 38, 85–92.
- Gardella, D., Hatton, W.J., Rind, H.B., Rosen, G.D., von Bartheld, C.S., 2003. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *J. Neurosci. Methods* 124, 45–59.
- Grattan, D.R., Kokay, I.C., 2008. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J. Neuroendocrinol.* 20, 752–763.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 147, 229–263.
- Gundersen, H.J., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., et al., 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 857–881.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., Kieu, K., Nielsen, J., 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. *J. Microsc.* 193, 199–211.
- Guo, J., Simmons, W.K., Herscovitch, P., Martin, A., Hall, K.D., 2014. Striatal dopamine D2-like receptor correlation patterns with human obesity and opportunistic eating behavior. *Mol. Psychiatry* 19, 1078–1084.
- Harper, C., 2009. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol* 44, 136–140.
- Hirosawa, M., Minata, M., Harada, K.H., Hitomi, T., Krust, A., Koizumi, A., 2008. Ablation of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) prevents upregulation of POMC by leptin and insulin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 371, 320–323.
- Jones, E.E., Naftolin, F., 1990. Estrogen effects on the tuberoinfundibular dopaminergic system in the female rat brain. *Brain Res.* 510, 84–91.

- Kachani, A.T., Brasiliano, S., Hochgraf, P.B., 2008. The impact of alcohol consumption on weight gain. *Arch. Clin. Psychiatry* 35, 21–24.
- Kiefer, F., Jahn, H., Jaschinski, M., Holzbach, R., Wolf, K., Naber, D., et al., 2001. Leptin: a modulator of alcohol craving? *Biol. Psychiatry* 49, 782–787.
- Kim, M.O., Lee, Y.K., Choi, W.S., Kim, J.H., Hwang, S.K., Lee, B.J., et al., 1997. Prolonged ethanol intake increases D2 dopamine receptor expression in the rat brain. *Mol. Cells* 7, 682–687.
- Kim, K.S., Yoon, Y.R., Lee, H.J., Yoon, S., Kim, S.Y., Shin, S.W., et al., 2010. Enhanced hypothalamic leptin signaling in mice lacking dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* 285, 8905–8917.
- Leal, S., Andrade, J.P., Paula-Barbosa, M.M., Madeira, M.D., 1998. Arcuate nucleus of the hypothalamus: effects of age and sex. *J. Comp. Neurol.* 401, 65–88.
- Leite, C.M., Szawka, R.E., Anselmo-Franci, J.A., 2008. Alpha-oestrogen and progesterin receptor expression in the hypothalamus and preoptic area dopaminergic neurones during oestrous in cycling rats. *J. Neuroendocrinol.* 20, 110–109.
- Lieber, C.S., 1991. Perspectives: do alcohol calories count? *Am. J. Clin. Nutr.* 54 (6), 976–982.
- Lovinger, D.M., 1993. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17, 19–27.
- Lucas, N., Legrand, R., Ouelaa, W., Breton, J., Tonnoune, N., Bole-Feysot, C., et al., 2014. Effects of rabbit anti- $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) immunoglobulins on  $\alpha$ -MSH signaling related to food intake control. *Neuropeptides* 48, 21–27.
- Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M., 1993. Reorganization of mossy fiber synapses in male and female hypothyroid rats: a stereological study. *J. Comp. Neurol.* 337, 334–352.
- Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M., 1999. Effects of alcohol on the synthesis and expression of hypothalamic peptides. *Brain Res. Bull.* 48, 3–22.
- Madeira, M.D., Sousa, N., Lieberman, A.R., Paula-Barbosa, M.M., 1993. Effects of chronic alcohol consumption and of dehydration on the supraoptic nucleus of adult male and female rats. *Neuroscience* 56, 657–672.
- Madeira, M.D., Sousa, N., Santer, R.M., Paula-Barbosa, M.M., Gundersen, H.J., 1995. Age and sex do not affect the volume, cell numbers, or cell size of the suprachiasmatic nucleus of the rat: an unbiased stereological study. *J. Comp. Neurol.* 361, 585–601.
- Madeira, M.D., Andrade, J.P., Lieberman, A.R., Sousa, N., Almeida, O.F., Paula-Barbosa, M.M., 1997. Chronic alcohol consumption and withdrawal do not induce cell death in the suprachiasmatic nucleus, but lead to irreversible depression of peptide immunoreactivity and mRNA levels. *J. Neurosci.* 17, 1302–1319.
- Malva, J.O., Xapelli, S., Baptista, S., Valero, J., Agasse, F., Ferreira, R., et al., 2012. Multifaces of neuropeptide Y in the brain – neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. *Neuropeptides* 46, 299–308.
- Maolood, N., Meister, B., 2008. Dynorphin in pro-opiomelanocortin neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience* 154, 1121–1131.
- Martins, S.I., Madeira, M.D., Sá, S.I., 2015. Effects of gonadal steroids and of estrogen receptor agonists on the expression of estrogen receptor alpha in the medial preoptic nucleus of female rats. *Neuroscience* 310, 63–72.
- McEwen, B.S., Akama, K.T., Spencer-Segal, J.L., Milner, T.A., Waters, E.M., 2012. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav. Neurosci.* 126, 4–16.
- Medina, F., Siddiqui, A., Scimonelli, T., Fenske, C., Wilson, C.A., Celis, M.E., 1998. The inter-relationship between gonadal steroids and POMC peptides, beta-endorphin and alpha-MSH, in the control of sexual behavior in the female rat. *Peptides* 19, 1309–1316.
- Meijer, J.H., Albus, H., Weidema, F., Ravesloot, J.-H., 1993. The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons. *Brain Res.* 603, 284–288.
- Meister, B., 2007. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 92, 263–271.
- Moore, K.E., Demarest, K.T., Lookingland, K.J., 1987. Stress, prolactin and hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuropharmacology* 26, 801–808.
- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., Schwartz, M.W., 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295.
- Mukherjee, S., 2013. Alcoholism and its effects on the central nervous system. *Curr. Neurovasc. Res.* 10, 256–262.
- Okamura, H., Kitahama, K., Nagatsu, I., Geffard, M., 1988. Comparative topography of dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* 95, 347–353.
- Olney, J.J., Sprow, G.M., Navarro, M., Thiele, T.E., 2014. The protective effects of the melanocortin receptor (MCR) agonist, melanotan-II (MTII), against binge-like ethanol drinking are facilitated by deletion of the MC3 receptor in mice. *Neuropeptides* 48, 47–51.
- Oomizu, S., Boyadjieva, N., Sarkar, D.K., 2003. Ethanol and estradiol modulate alternative splicing of dopamine D2 receptor messenger RNA and abolish the inhibitory action of bromocriptine on prolactin release from the pituitary gland. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27, 975–980.
- Parish, D.C., Rodríguez, E.M., Birkett, S.D., Pickering, B.T., 1981. Effects of small doses of colchicine on the components of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Cell Tissue Res.* 220, 809–827.
- Paula-Barbosa, M.M., Brandão, F., Madeira, M.D., Cadete-Leite, A., 1993. Structural changes in the hippocampal formation after long-term alcohol consumption and withdrawal in the rat. *Addiction* 88, 237–247.
- Pereira, P.A., Santos, D., Neves, J., Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M., 2013. Nerve growth factor retrieves neuropeptide Y and cholinergic immunoreactivity in the nucleus accumbens of old rats. *Neurobiol. Aging* 34, 1988–1995.
- Pereira, P.A., Neves, J., Vilela, M., Sousa, S., Cruz, C., Madeira, M.D., 2014. Chronic alcohol consumption leads to neurochemical changes in the nucleus accumbens that are not fully reversed by withdrawal. *Neurotoxicol. Teratol.* 44, 53–61.
- Pereira, P.A., Rocha, J.P., Cardoso, A., Vilela, M., Sousa, S., Madeira, M.D., 2016. Effects of chronic alcohol consumption, withdrawal and nerve growth factor on neuropeptide Y expression and cholinergic innervation of the rat dentate hilus. *Neurotoxicology* 54, 153–160. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.04.007.
- Peterson, G.M., Moore, R.Y., 1980. Selective effects of kainic acid on diencephalic neurons. *Brain Res.* 202, 165–182.
- Racine, S.E., Culbert, K.M., Keel, P.K., Sisk, C.L., Burt, S.A., Klump, K.L., 2012. Differential associations between ovarian hormones and disordered eating symptoms across the menstrual cycle in women. *Int. J. Eat. Disord.* 45, 333–344.
- Rasmussen, D.D., Mitton, D.R., Green, J., Puchalski, S., 2001. Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 999–1005.
- Romero-Fernandez, W., Borroto-Escuela, D.O., Vargas-Barroso, V., Narváez, M., Di Palma, M., Agnati, L.F., et al., 2014. Dopamine D1 and D2 receptor immunoreactivities in the arcuate-median eminence complex and their link to the tubero-infundibular dopamine neurons. *Eur. J. Histochem.* 58, 2400.
- Roy, A., Pandey, S.C., 2002. The decreased cellular expression of neuropeptide Y protein in rat brain structures during ethanol withdrawal after chronic ethanol exposure. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26, 796–803.
- Sanchis, R., Esquifino, A., Guerri, C., 1985. Chronic ethanol intake modifies estrous cyclicity and alters prolactin and LH levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 23, 221–224.
- Sar, M., Sahu, A., Crowley, W.R., Kalra, S.P., 1990. Localization of neuropeptide-Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus. *Endocrinology* 127, 2752–2756.
- Shelkar, G.P., Kale, A.D., Singh, U., Singru, P.S., Subhedar, N.K., Kokare, D.M., 2015. Alpha-melanocyte stimulating hormone modulates ethanol self-administration in posterior ventral tegmental area through melanocortin-4 receptors. *Addict. Biol.* 20, 302–315.
- Shimizu, H., Ohtani, K., Kato, Y., Tanaka, Y., Mori, M., 1996. Withdrawal of estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neurosci. Lett.* 204, 81–84.
- Shughrue, P.J., Komm, B., Merchenthaler, I., 1996. The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids* 61, 678–681.
- Shughrue, P.J., Scrimo, P.J., Merchenthaler, I., 1998. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology* 139, 5267–5270.
- Silva, S.M., Madeira, M.D., 2012. Effects of chronic alcohol consumption and withdrawal on the response of the male and female hypothalamic-pituitary-adrenal axis to acute immune stress. *Brain Res.* 1444, 27–37.
- Silva, S.M., Madeira, M.D., Ruela, C., Paula-Barbosa, M.M., 2002a. Prolonged alcohol intake leads to irreversible loss of vasopressin and oxytocin neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 925, 76–88.
- Silva, S.M., Paula-Barbosa, M.M., Madeira, M.D., 2002b. Prolonged alcohol intake leads to reversible depression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus. *Brain Res.* 954, 82–93.
- Silva, S.M., Santos-Marques, M.J., Madeira, M.D., 2009. Sexually dimorphic response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to chronic alcohol consumption and withdrawal. *Brain Res.* 1303, 61–73.
- Silva, L.E., Castro, M., Amaral, F.C., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L., 2010. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 759–766.
- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W., 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294, 76–95.
- Sohrabji, F., 2002. Neurodegeneration in women. *Alcohol Res. Health* 26, 316–318.
- Sullivan, E.V., Fama, R., Rosenbloom, M.J., Pfefferbaum, A., 2002. A profile of neuropsychological deficits in alcoholic women. *Neuropsychology* 16, 74–83.
- Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1984. Remodeling of the cerebellar glomeruli after long-term alcohol consumption in the adult rat. *Brain Res.* 309, 217–226.
- Thiele, T.E., Navarro, M., Sparta, D.R., Fee, J.R., Knapp, D.J., Cubero, I., 2003. Alcoholism and obesity: overlapping neuropeptide pathways? *Neuropeptides* 37, 321–337.
- Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F., 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18, 158–168.
- van de Giessen, E., Celik, F., Schweitzer, D.H., van den Brink, W., Booij, J., 2014. Dopamine D2/3 receptor availability and amphetamine-induced dopamine release in obesity. *J. Psychopharmacol.* 28, 866–873.
- Vianna, C.R., Coppari, R., 2011. A treasure trove of hypothalamic neurocircuitries governing body weight homeostasis. *Endocrinology* 152, 11–18.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Baler, R.D., 2011. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn. Sci.* 15, 37–46.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482–497.
- Wurst, F.M., Bechtel, G., Forster, S., Wolfersdorf, M., Huber, P., Scholer, A., et al., 2003. Leptin levels of alcohol abstainers and detoxification patients are not different. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27, 364–368.
- Yamada, S., Noguchi, D., Ito, H., Yamanouchi, K., 2009. Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor  $\alpha$ -immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain. *Neurosci. Lett.* 463, 135–139.



## **DISCUSSÃO GERAL**

Nos trabalhos constantes na presente tese, pretendeu-se avaliar de que forma a regulação do consumo alimentar centrada no ARN (1) é influenciada por estímulos hormonais e (2) é sensível à exposição prolongada a uma neurotoxina.

O primeiro trabalho foi executado no sentido de se avaliar a ocorrência de alterações induzidas pelo estradiol na expressão de neuropeptídeos do ARN que estão envolvidos na regulação do consumo e qual a sua repercussão no comportamento alimentar de fêmeas Wistar. Com efeito, o estradiol induz a redução da ingestão alimentar, bem como a alterações recíprocas na expressão de peptídeos do ARN, especificamente na expressão de NPY e de  $\alpha$ -MSH, ambos neuropeptídeos associados à regulação do comportamento alimentar.

Os resultados dos estudos que deram origem ao primeiro trabalho que compõe esta tese corroboram estudos anteriores, ao mostrar que, após a ovariectomia, as fêmeas ingerem maior quantidade de comida e apresentam um acentuado ganho de peso corporal (Asarian e Geary, 2002, 2006; Silva *et al.*, 2010; Eckel, 2011). A reposição de estradiol induz a redução da quantidade de comida ingerida e a normalização do ganho de peso corporal. Estas alterações são consequência da influência do estradiol na inibição da expressão de peptídeos orexigénios e na estimulação da expressão de peptídeos anorexigénios no ARN (Leibowitz *et al.*, 1998; Hirosawa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010; Eckel, 2011). Com efeito, os resultados obtidos neste estudo demonstram, pela primeira vez por métodos estereológicos, que o estradiol induz, em simultâneo, a diminuição da síntese proteica de NPY e o aumento da síntese proteica de  $\alpha$ -MSH. Estes dados confirmam e estendem estudos anteriores relativos à síntese de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do NPY e do POMC no ARN (Bauer-Dantoin, *et al.*, 1992; Medina *et al.*, 1998; Clegg *et al.*, 2007; Hirosawa *et al.*, 2008; Santollo e Eckel, 2008; Silva *et al.*, 2010) e a existência de flutuações, determinadas por técnicas de radioimunoensaio, nos níveis do NPY e do  $\alpha$ -MSH em resposta aos níveis de estradiol

circulante (Leibowitz *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1998). No presente estudo, os animais foram injetados com colquicina antes da última administração de EB, que permitiu bloquear o transporte intracelular dos neuropeptídeos. Desta forma, pode-se afirmar que as alterações observadas estão relacionadas com a inibição da síntese de NPY ou com a estimulação da síntese de  $\alpha$ -MSH e não com alterações na libertação dos neuropeptídeos ou com a síntese dos seus mRNAs respetivos. Assim, os dados dão suporte à existência de um efeito anorexigénio do estradiol, uma vez que interfere na síntese de peptídeos em neurónios do ARN envolvidos no balanço energético. Este trabalho, assim como trabalhos anteriores (Morton *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2010; Larco *et al.*, 2012; Cyr *et al.*, 2013), aponta para uma regulação recíproca destes peptídeos, uma vez que o somatório dos neurónios de ambas as populações é igual nos dois estados fisiológicos. Porém, permanece por esclarecer se a população neuronal que expressa NPY também expressa  $\alpha$ -MSH e se os dois peptídeos são expressos em simultâneo ou alternadamente.

O NPY modula diretamente a expressão do  $\alpha$ -MSH no ARN, inibindo a conversão do POMC, por redução da ação da convertase PC2 (Morton *et al.*, 2006; Cyr *et al.*, 2013). Estas evidências sugerem a existência de uma interação direta e cíclica entre estes peptídeos, no sentido de que o aumento da síntese de um inibe a síntese do outro, quer nos mesmos, quer em neurónios diferentes, de forma a direcionar a ingestão alimentar e o gasto energético. A ação do estradiol no comportamento alimentar é mediada pelo ER $\alpha$  que é abundantemente expresso no ARN (Chakraborty *et al.*, 2003, 2008), havendo coexpressão com o NPY e com o POMC (Sar *et al.*, 1990; Geary *et al.*, 2001; Roesch, 2006; Hirosawa *et al.*, 2008). Esta interação sugere a existência de uma ação direta do estradiol, por ativação do ER $\alpha$  do ARN, na inibição da expressão do NPY e aumento da expressão de  $\alpha$ -MSH. Desta forma, as flutuações cíclicas de estradiol nas fêmeas parecem promover um reajuste na interação direta

do NPY/ $\alpha$ -MSH, fazendo variar o seu sentido para o predomínio da ação anorexigénia nas fases em que os níveis de estradiol são elevados.

Uma outra hormona periférica candidata à mediação do efeito anorexigénio é a leptina, hormona supressora do apetite, que tem especial ação no ARN (Sato *et al.*, 1997), onde seus recetores Ob-R são coexpressos com o NPY e com o POMC (Baskin *et al.*, 1998; Cowley *et al.*, 2001; Munzberg *et al.*, 2003; Caron *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2010; Gamber *et al.*, 2012). De facto, há evidência de que o efeito anorexigénio da leptina ocorre por inibição da expressão do NPY e por estimulação da expressão do POMC no ARN (Cone *et al.*, 2001; Higuchi *et al.*, 2005; Hirosawa *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Sabe-se ainda que o estradiol não exerce ação sobre a expressão da leptina, mas é capaz de induzir a expressão dos recetores Ob-R no ARN (Sandoval *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2010; Larco *et al.*, 2012), que são coexpressos com os ER $\alpha$  (Diano *et al.*, 1998; Siawrys *et al.*, 2009). Estas evidências sugerem que o efeito inibitório do estradiol na ingestão de alimentos pode ocorrer por um mecanismo de regulação direto, sobre o NPY e o  $\alpha$ -MSH, ou por um mecanismo indireto, através da regulação da leptina, mediados ambos pela ativação do ER $\alpha$  (Hirosawa *et al.*, 2008). A hipótese sugerida por Hirosawa e colaboradores (2008) aponta para uma regulação recíproca destes neuropeptídeos, resultando no ajuste do consumo às necessidades calóricas advindas das diferentes respostas fisiológicas ao longo do ciclo éstrico.

O principal objetivo do segundo trabalho desta tese foi o de avaliar o efeito do consumo crónico do etanol e da sua abstinência na morfologia e neuroquímica do ARN e a sua relação com o comportamento alimentar. E mostrou-se que a exposição crónica ao etanol interfere na ingestão alimentar e no gasto energético, através de mecanismos diferentes daqueles que são induzidos pelo estradiol. Intrigante foi verificar que a retirada do etanol foi mais severa para o ARN do que o seu consumo *per se*, evidenciando a maior suscetibilidade

das fêmeas à abstinência do que ao consumo de etanol. Os resultados obtidos que mostram que o consumo crônico de etanol afeta o comportamento alimentar e o ganho de peso destes animais está de acordo com estudos anteriores (Patterson-Buckendahl *et al.*, 2005; Suter, 2005; Silva *et al.*, 2009). Em concordância com a literatura (Silva *et al.*, 2009), os animais tratados com etanol apresentaram um aumento no aporte energético, mas também um menor ganho de peso, comparativamente aos animais controle. No entanto, estas variações não parecem estar relacionadas com as alterações morfológicas e funcionais verificadas no ARN. Apesar do consumo de etanol em baixas concentrações estar associado ao aumento do desejo de alimento (Konturek *et al.*, 2004, 2005), o seu consumo crônico parece não apresentar esse mesmo efeito e contribui com parte das calorias aportadas pelo indivíduo. O álcool, por ser uma substância com alto valor calórico (7,1 kcal/g) oferece um grande aporte energético, substituindo as calorias obtidas do alimento sólido. No entanto, as calorias providas pelo etanol são vazias (Kachani *et al.*, 2008), ou seja, não possuem nutrientes essenciais, tais como proteínas, vitaminas e oligoelementos, comprometendo o ganho de peso corporal que fica abaixo dos valores observados em animais controle (Silva *et al.*, 2009). Os resultados obtidos sugerem que o aumento da energia aportada pelos animais tratados adveio das calorias fornecidas pelo etanol que, sendo uma substância tóxica, a sua metabolização é prioritária aos demais nutrientes (Kachani *et al.*, 2008) e, por serem calorias vazias, não fornecem ao organismo os nutrientes essenciais para um ganho de peso ao dos ratos controles (Silva *et al.*, 2009). Após dois meses de abstinência do etanol, verificou-se o esperado aumento da quantidade de alimento ingerido diariamente e do peso corporal para valores semelhantes ao de animais controle, o que está em concordância com trabalhos anteriores (Silva *et al.*, 2009). As alterações observadas na ingestão de alimentos e no ganho de peso não encontram suporte na expressão dos neuropeptídeos que regulam a ingestão de alimentos e o gasto energético no ARN.

Os resultados deste trabalho mostram que o consumo crónico e elevado de etanol não induz alterações estruturais no ARN de fêmeas, especificamente no número total de neurónios e no volume do ARN. Estes resultados estão em concordância com estudos prévios em outros núcleos hipotalâmicos, como o PVN, após o consumo de etanol nas mesmas condições experimentais (Madeira *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2009). No entanto, outros trabalhos realizados em ratos machos, utilizando a mesma metodologia, demonstraram uma redução no número de neurónios e no volume de outras áreas do SNC, nomeadamente no prosencéfalo basal e na formação do hipocampo (Paula-Barbosa *et al.*, 1993; Cadete-Leite *et al.*, 2003). Estas divergências podem ser explicadas pelo diferente fenótipo nas respostas neuronais dessas áreas do SNC ao etanol e/ou pela maior suscetibilidade aos efeitos neurotóxicos do etanol exibida pelos machos (Madeira *et al.*, 1997; Wiren, 2013), demonstrando assim a existência de dimorfismo sexual nas respostas ao consumo de álcool em algumas áreas encefálicas.

Sabe-se que os efeitos deletérios do etanol ocorrem por excitotoxicidade neuronal (Lovinger, 1993; De Witte, 2004) e que os peptídeos NPY e  $\alpha$ -MSH são considerados potentes agentes neuroprotetores contra a excitotoxicidade (Baraban, 2004; Forslin Aronsson *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013; Olney *et al.*, 2014a). De facto, o NPY não só reduz a hiperexcitabilidade, por inibir a libertação excessiva do glutamato, como está também relacionado com a prevenção da morte celular por excitotoxicidade (Malva *et al.*, 2012). O  $\alpha$ -MSH é conhecido por aumentar a viabilidade dos neurónios do hipotálamo após a exposição aos efeitos excitotóxicos do ácido caínico, bem como por apresentar um efeito neuroprotetor na isquemia cerebral (Forslin Aronsson *et al.*, 2006, 2007). Desta forma, os presentes resultados parecem sugerir que a maior resistência do ARN aos efeitos deletérios do etanol seja devida à expressão destes peptídeos que também induzem efeitos neuroprotetores. Os resultados do presente estudo mostram que o número de neurónios do

ARN que expressam NPY e  $\alpha$ -MSH não foi afetado pela exposição ao etanol e é, curiosamente, semelhante ao registado nas fêmeas ovariectomizadas não suplementadas com EB. Uma vez que o consumo de etanol afeta o ciclo éstrico (Sanchis *et al.*, 1985; Emanuele *et al.*, 2001) prolongando as fases com baixos níveis de estradiol (Silva e Madeira, 2012) e que os animais usados neste trabalho foram aleatoriamente selecionados nas diferentes fases do ciclo éstrico, existe uma grande probabilidade de as fêmeas estudadas estarem sob a influência de baixos níveis de estradiol circulante. Estes resultados sugerem que o estradiol pode exercer uma maior influência sobre a expressão dos peptídeos envolvidos no comportamento alimentar do que o etanol, assim sendo, a expressão peptídica observada neste estudo no ARN poderá estar relacionada com os níveis séricos do estradiol.

Que tenhamos conhecimento, é a primeira vez que se avalia o efeito do consumo crónico de etanol na expressão do ER $\alpha$  no ARN de ratos fêmeas. Os resultados obtidos mostram que o consumo de etanol afeta a expressão deste recetor, induzindo um pequeno, mas significativo, aumento do número de neurónios ER $\alpha$ -imunorreativos no ARN. Estes resultados estão de acordo com o verificado em estudos anteriores no hipotálamo de ratos que mostram baixos níveis de estradiol induzem o aumento da expressão de ER $\alpha$  (Lauber *et al.*, 1991; Yamada *et al.*, 2009), corroborando a noção de que, neste estudo, as fêmeas estariam sob a influência de baixos níveis de estradiol circulante. Além do seu conhecido papel na ingestão de alimentos (Geary *et al.*, 2001; Roesch, 2006), este recetor está também envolvido na resposta ao stress, tendo sido observado o aumento da expressão do ER $\alpha$  no hipotálamo e em outras áreas do SNC em animais sob stress e com baixos níveis de hormonas ovarianas (Ruscio *et al.*, 2009; Kercmar *et al.*, 2014). Considerando que os neurónios no ARN coexpressam ER $\alpha$  tanto com o NPY como com o  $\alpha$ -MSH, pode-se inferir que este recetor no ARN pode desempenhar um papel relevante na ação exercida pelos referidos neuropeptídeos na resposta ao stress induzido pelo etanol. Desta forma, o ER $\alpha$  pode mediar

um possível efeito neuroprotetor do estradiol através da ativação do NPY e/ou do  $\alpha$ -MSH no ARN. Com efeito, estudos recentes demonstraram o efeito neuroprotetor do estradiol em danos encefálicos causados por trauma, bem como pelo álcool (Firozan *et al.*, 2014; Khaksari *et al.*, 2015). O estradiol inibe o dano da barreira hematoencefálica após o trauma cerebral e previne a perda de células de Purkinje em animais tratados com etanol, ajudando na sobrevivência neuronal e na neurogênese (Firozan *et al.*, 2014; Khaksari *et al.*, 2015). Um outro estudo recente evidencia a mediação, pelo ER $\alpha$ , de mecanismos de neuroproteção do estradiol em lesões da medula espinhal (Mosquera *et al.*, 2014), sugerindo um papel do estradiol, via a ativação do ER $\alpha$ , na resistência ao etanol observado no ARN, provavelmente por ativação do NPY e/ou do  $\alpha$ -MSH.

Neste estudo não foi verificada qualquer alteração no número de neurónios imunorreativos à TH, enzima que catalisa o primeiro passo na síntese da DA, quer após o consumo prolongado de etanol quer após a sua abstinência, sugerindo que ambas as condições parecem não induzir alteração na síntese desta monoamina. No entanto, sabe-se que a DA participa em mecanismos de recompensa e de vício, sendo um importante neurotransmissor envolvido na ingestão alimentar. O papel da DA no comportamento alimentar está relacionado com a regulação de mecanismos de recompensa, envolvendo a via mesolímbica por meio de projeções dopaminérgicas da VTA para áreas límbicas, como o NAc (Kim *et al.*, 2010), que alcançam núcleos hipotalâmicos envolvidos na ingestão alimentar, nomeadamente o ARN (Meguid *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010), e que estão relacionadas com os mecanismos de recompensa e com os de controlo de balanço energético. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a exposição crónica ao etanol e a sua abstinência não afetam a população dopaminérgica do ARN. Possivelmente, a síntese da DA no ARN estará envolvida em outras funções amplamente reconhecidas,



como a inibição da libertação da prolactina pela hipófise (Leite *et al.*, 2008) e a regulação da hormona libertadora da hormona luteinizante (Romero-Fernandez *et al.*, 2014). Assim, é provável que os mecanismos de recompensa e de vício, desencadeados pelo consumo de álcool, não tenham o ARN como um participante de relevo, ficando este papel a cargo de outros núcleos hipotalâmicos que também recebam projeções do NAc (Meguid *et al.*, 2000). Contudo, os neurónios dopaminérgicos no ARN parecem ser mediados pelo estradiol, uma vez que coexpressam ER $\alpha$  (Hou *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2008). Sabe-se que o estradiol, via a ativação de ER $\alpha$ , estimula a síntese da prolactina, uma ação oposta à exercida pela DA, e regula a secreção da hormona luteinizante (Anderson *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2009; MohanKumar *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013). Assim, parece que o papel desempenhado pelo ER $\alpha$  em neurónios dopaminérgicos do ARN esteja relacionado com a libertação da prolactina por inibição da síntese de DA (Hou *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2008; MohanKumar *et al.*, 2011), sendo pouco provável a sua participação na regulação do comportamento alimentar. Existe ainda uma forte possibilidade de a hiperprolactinémia induzida pelo etanol, descrita em estudos anteriores (Sarkar, 2010; Li *et al.*, 2011), não esteja relacionada com a expressão da DA no ARN, mas com a libertação da prolactina pela hipófise.

A abstinência de álcool é considerada como sendo crucial na recuperação do alcoolismo, uma vez que esta modificação de comportamento é capaz de, *per se*, atenuar os danos causados pelo consumo crónico de etanol. Os indivíduos que sofrem de alcoolismo, bem como as pessoas a eles diretamente relacionadas, encaram a abstinência como o remédio de todos os males causados pela doença. No entanto, o presente trabalho, assim como outros publicados anteriormente versando outras áreas do SNC (Paula-Barbosa *et al.*, 1993; Cadete-Leite *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2014), mostram que o consumo crónico de etanol, mesmo depois de um longo período de abstinência, induz alterações no SNC que poderão ser

irreversíveis. Particularmente no ARN, a abstinência de etanol após o seu consumo crónico, foi mais prejudicial do que o consumo de álcool, induzindo redução do volume do ARN e do número total dos seus neurónios. Estes danos estruturais podem ser consequência, em grande parte, do stress causado pela abstinência de etanol (Alele e Devaud, 2013), sugerindo que os mecanismos de neuroprotecção ativados pelo estradiol no ARN são diferentes, ou são ineficazes, nos animais abstinentes do que os desencadeados durante o consumo de etanol. Esta hipótese parece estar de acordo com a diminuição do número de neurónios ER $\alpha$ -imunorreativos no ARN dos animais abstinentes observada no presente trabalho, o que sugere uma menor capacidade adaptativa do organismo à abstinência do que ao consumo de álcool *per se*.

Estudos prévios mostraram que a exposição ao etanol e a sua abstinência afetam a expressão do NPY no SNC (Ehlers *et al.*, 1998; Bison e Crews, 2003), induzindo a redução da expressão do NPY, nomeadamente no hipocampo e no córtex cerebral. No entanto, o mesmo estudo demonstrou uma diminuição na expressão deste neuropeptídeo no ARN nas primeiras 72h de abstinência que foi completamente revertido uma semana depois (Bison e Crews, 2003). Outros estudos demonstraram que a exposição de longa duração ao etanol não afeta a expressão do NPY no hipotálamo e no hipocampo, contudo, a abstinência prolongada foi capaz de induzir um acentuado aumento da sua expressão, tanto no hipotálamo como na formação do hipocampo (Ehlers *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2016). Os nossos dados estendem estes resultados e mostram que após dois meses de abstinência se verifica o aumento da síntese de NPY no ARN, reforçando a ideia de que este peptídeo esteja relacionado com outras funções do ARN e não apenas com a regulação do comportamento alimentar. De facto, foi já demonstrado o envolvimento do NPY expresso no ARN em mecanismos de resposta a situações de stress (Kim *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2013) e de protecção contra a excitotoxicidade celular (Malva *et al.*, 2012). Desta forma, o aumento da

expressão do NPY sugere que os danos estruturais causados no ARN podem ter sido consequência de um aumento da excitotoxicidade induzida durante a abstinência de álcool, que foi depois contido pelo subsequente aumento da expressão do peptídeo.

Em consonância com os resultados do consumo de alimentos e da síntese de NPY obtidos, seria exetável uma diminuição da expressão de  $\alpha$ -MSH no ARN após a abstinência. Estes dados parecem corroborar a noção de que, após a abstinência, o NPY do ARN desempenha um papel determinante na neuroprotecção, podendo estar a ser expresso numa outra população neuronal que não tem envolvimento direto no controlo da ingestão alimentar. Desta forma, durante a abstinência, pode haver o estabelecimento de um novo equilíbrio entre o NPY e o  $\alpha$ -MSH, sendo a inalterada expressão de  $\alpha$ -MSH o resultado da ativação de um novo mecanismo regulatório entre estes neuropeptídeos, em que o NPY participa em mais do que numa só função. Por outro lado, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o  $\alpha$ -MSH poderá desempenhar um papel diferente numa situação de consumo de álcool ou durante a abstinência. De facto, durante o consumo de álcool, o  $\alpha$ -MSH parece ser responsável pelo efeito ansiolítico e pela ativação de mecanismos neuroprotetores em algumas áreas encefálicas (Olney *et al.*, 2014a, b); porém, na abstinência, parece estar envolvido na modulação de efeitos opostos, tais como a ansiedade e sintomas análogos aos da depressão (Kokare *et al.*, 2008; Olney *et al.*, 2014a). Além do mais, os recetores MC apresentam diferentes ações durante a exposição ao etanol, por exemplo, a ativação do MC3R parece mediar o consumo compulsivo, enquanto a ativação do MC4R parece diminuir a ingestão voluntária de álcool (Olney *et al.*, 2014a, b; Shelkar *et al.*, 2015). Desta forma, os resultados obtidos parecem reforçar a ideia de que o aumento do número de neurónios NPY, bem como os níveis altos de neurónios que expressam o  $\alpha$ -MSH no ARN de fêmeas abstinentes, podem fazer parte de diferentes mecanismos de ação desencadeados pela abstinência ao etanol. Assim, é possível que haja um envolvimento do

NPY na resposta ao stress, enquanto o  $\alpha$ -MSH poderá estar envolvido nos efeitos nocivos da abstinência e, nesta nova dinâmica, o efeito neuroprotetor do estradiol ser apenas desencadeado tardiamente, não sendo suficiente para evitar a neurodegeneração.

Dos estudos englobados na presente tese, pode-se concluir que o estradiol afeta a ingestão de alimentos e o gasto energético, induzindo alterações na expressão de peptídeos do ARN envolvidos na regulação do comportamento alimentar causando, por isso, um efeito anorexigénio através da inibição da expressão do NPY e da estimulação da expressão do  $\alpha$ -MSH. Além do mais, mostrou-se que o estradiol, por ativação do ER $\alpha$ , parece mediar a regulação recíproca entre o NPY e o  $\alpha$ -MSH no ARN, quer diretamente via ativação do ER $\alpha$  quer indiretamente através da ação da leptina.

Mostrou-se ainda que a ingestão de alimentos e o ganho de peso corporal dos animais alcoolizados não difere dos animais controlo isocalóricos. Acresce que o consumo crónico de álcool não afeta a estrutura do ARN nem a expressão nos seus neurónios NPY,  $\alpha$ -MSH e TH, mas afeta a expressão do ER $\alpha$  neste núcleo. Estes resultados sugerem que o consumo elevado e prolongado de etanol não exerce efeito estimulante nem inibitório no apetite, mas reforça a ideia de haver uma sobreposição das vias que controlam a ingestão de alimentos e o consumo de álcool. Pelo contrário, a abstinência de etanol induziu alterações de natureza estrutural e na expressão do NPY no ARN. As diferentes respostas observadas neste estudo, no consumo de etanol e na sua abstinência, provavelmente estão relacionadas com mecanismos neuroprotetores do estradiol mediados pelo ER $\alpha$ , sendo estes mais eficientes durante o consumo do que na sua abstinência. Estes resultados sugerem a existência de outros papéis exercidos pelo NPY, pelo  $\alpha$ -MSH e pelo ER $\alpha$  no ARN, tais como a neuroprotecção, corroborando o conceito de que o ARN poderá ter uma participação preponderante na adaptação do indivíduo a novas condições ambientais.

Importante será salientar que a abstinência de álcool, após consumo prolongado, causa mais danos ao ARN de fêmeas do que o consumo de álcool *per se*, o que apoia a ideia de maior suscetibilidade das fêmeas aos efeitos deletérios que ocorrem durante a abstinência de etanol.

## **CONCLUSÕES**

Baixos níveis séricos de estradiol induzem o aumento da síntese do NPY e a diminuição da síntese do  $\alpha$ -MSH em neurónios do ARN, induzindo o aumento da ingestão de alimentos e a diminuição do gasto energético, que se traduz no aumento do peso corporal.

O EB, pelo contrário, induz a diminuição da síntese do NPY o aumento da síntese do  $\alpha$ -MSH no ARN, diminuindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto energético, levando à perda de peso.

A flutuação do número de neurónios do ARN que expressam NPY e  $\alpha$ -MSH parece sugerir uma regulação recíproca direta entre estes dois neuropeptídeos, que se traduz numa adaptação do controlo do consumo alimentar e do gasto energético.

O estradiol parece fazer o reajuste da regulação recíproca entre o NPY e o  $\alpha$ -MSH no ARN, de forma a sobrepor as variações no consumo de acordo com as diferentes respostas fisiológicas desencadeadas nas diferentes fases do ciclo éstrico. Esta ação poderá ser direta, mediada pelo ER $\alpha$ , ou indireta por meio da modulação da expressão de recetores de leptina neste núcleo.

O consumo crónico de etanol fornece parte das calorias diárias necessárias ao indivíduo, reduzindo a ingestão de alimentos. Uma vez que o etanol tem calorias vazias, o consumo de alimentos é insuficiente para os gastos energéticos do animal, levando à perda de peso. Este comportamento é revertido na abstinência.

O consumo crónico do etanol não induz alterações na morfologia nem na síntese de NPY ou do  $\alpha$ -MSH no ARN. Pelo contrário, o consumo crónico do etanol aumenta a expressão de ER $\alpha$  no ARN. Estes resultados parecem indicar a participação deste recetor e dos neuropeptídeos estudados na resposta ao stress, sugerindo a sua participação nos mecanismos de neuroadaptação.

A abstinência induz dano na morfologia do ARN, sugerindo que a retirada do etanol é mais prejudicial para as fêmeas do que a exposição a esta substância.

O aumento da síntese de NPY e a ausência de alterações na síntese de  $\alpha$ -MSH no ARN, após a abstinência de etanol, relacionam-se com a normalização do consumo de alimento e fornece suporte para a ideia de que a regulação destes neuropeptídeos muda nas respostas do organismo a situações de stress, talvez devido à sua ação noutros mecanismos de resposta ao stress. O elevado número de neurónios imunorreativos ao ER $\alpha$  verificado no ARN das fêmeas abstinentes corrobora a proposta de participação do estradiol nestes mecanismos.

A ausência de efeito do consumo do etanol e da sua abstinência sobre a população de neurónios que expressam TH indica que, muito provavelmente, o ARN não faz parte das vias dopaminérgicas de recompensa envolvidas no vício e na dependência de drogas e na ingestão de alimentos.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abreu D. 2015. "Porre de perdas" Brasil perde 7,3% do PIB por ano com consumo excessivo de bebidas alcoólicas. Uni. Pesq. E Droga. <http://www.uniad.org.br> (Online).
- Alamri BN, Shin K, Chappe V, Anini Y. 2016. The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig* 26(1):3-11.
- Alele PE, Devaud LL. 2013. Expression of cFos and brain-derived neurotrophic factor in cortex and hippocampus of ethanol-withdrawn male and female rats. *J Pharmacol Pharmacother* 4(4):265-274.
- Almeida RMM, Pasa GG, Scheffer M. 2009. Álcool e violência em homens e mulheres. *Psicologia: Reflexos e Críticas* 22(2):253-260.
- Anderson EJ, Çakir I, Carrington SJ, Cone RD, Ghamari-Langroudi M, Gillyard T, Gimenez LE, Litt MJ. 2016. 60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by  $\alpha$ -MSH. *J Mol Endocrinol* 56(4):T157-174.
- Anderson GM, Kieser DC, Steyn FJ, Grattan DR. 2008. Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. *Endocrinology* 149(4):1562-1570.
- Arora S, Anubhuti. 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – a review. *Neuropeptides* 40(6):375-401.
- Asarian L, Geary N. 2002. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm. Behav* 42:461-471.
- Asarian L, Geary N. 2006. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1251-1263.
- Asarian L, Geary N. 2013. Sex differences in the physiology of eating. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305(11):R1215-1267.

- Asarian L, Langhans W. 2010. A new look on brain mechanisms of acute illness anorexia. *Physiol Behav* 100:464-471.
- Bachmanov AA, Reed DR, Tordoff MG, Price RA, Beauchamp GK. 2001. Nutrient preference and diet-induced adiposity in C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Physiol Behav* 72:603-613.
- Balasubramaniam AA. 1997. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists. *Peptides* 18(3):445-457.
- Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, TangV, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB. 2005. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123(3):493-505.
- Baraban SC. 2004. Neuropeptide Y and epilepsy: recent progress, prospects and controversies. *Neuropeptides* 38(4):261-265.
- Baskin DG, Norwood BJ, Schwartz MW, Koerker DJ. 1995. Estradiol inhibits the increase of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression induced by weight loss in ovariectomized rats. *Endocrinology* 136:5547-5554.
- Baskin DG, Seeley RJ, Kuijper JL, Lok S, Weigle DS, Erickson JC, Palmiter RD, Schwartz MW. 1998. Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes* 47:538-543.
- Bauer-Dantoin AC, Urban JH, Levine JE. 1992. Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus is increased during preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 131:2953-2958.

- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E. 2005. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinol* 146(4):1650-73.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22(6):724-63.
- Berridge KC. 2007. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology* 191(3):391-431.
- Bi S. 2007. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in energy homeostasis. *Peptides* 28(2):352-356.
- Bison S, Crews F. 2003. Alcohol withdrawal increases neuropeptide Y immunoreactivity in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 27(7):1173-1183.
- Bjornstrom L, Sjoberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19(4):833-842.
- Blomqvist AG, Herzog H. 1997. Y-receptor subtypes – how many more? *Trends Neurosci* 20(7):294-298.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behaviour in mice. *J. Neurosci.* 2004; 24: 2797-2805.
- Bucho, MSCRC. 2012. Fisiopatologia da Doença Hepática Alcoólica. Tese apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
- Buffenstein R, Poppitt SD, McDevitt RM, Prentice AM. 1995. Food intake and the menstrual cycle: a retrospective analysis, with implications for appetite research. *Physiol Behav* 58:1067–1077.

- Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. 2000. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 407(6802):377-382.
- Butler AA. 2006. The melanocortin system and energy balance. *Peptides* 27(2):281-290.
- Caberlotto L, Thorsell A, Rimondini R, Sommer W, Hyytiä P, Heilig M. 2001. Differential expression of NPY and its receptors in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res* 25(11):1564-1569.
- Cadete-Leite A, Pereira PA, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. 2003. Nerve growth factor prevents cell death and induces hypertrophy of basal forebrain cholinergic neurons in rats withdrawn from prolonged ethanol intake. *Neuroscience* 119(4):1055-1069.
- Cardozo MM. 2002. Padronização da metodologia para obtenção de decíduoma em ratas (*Rattus norvegicus*, var, Wistar). Monografia, Universidade Federal do Paraná.
- Carneiro A, Assunção M, De Freitas V, Paula-Barbosa MM, Andrade JP. 2008. Red Wine, but not port wine, protects rat hippocampal dentate gyrus against ethanol-induced neuronal damage-relevance of the sugar content. *Alcohol Alcohol* 43(4):408-415.
- Caron E, Sachot C, Prevot V, Bouret SG. 2010. Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *J Comp Neurol* 518:459-476.
- Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. 1990. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11(2): 201-220.
- Chakraborty S, Sachdev, A, Salton SRJ, Chakraborty TR. 2008. Stereological analysis of estrogen receptor expression in the hypothalamic arcuate nucleus of ob/ob and agouti mice. *Brain Res* 1217:86-95.
- Chakraborty TR, Hof PR, Ng L, Gore AC. 2003. Stereologic analysis of estrogen receptor alpha (ER alpha) expression in rat hypothalamus and its regulation by aging and estrogen. *J Comp Neurol* 466:409-421.

- Chandra R, Liddle RA. 2014. Recent advances in the regulation of pancreatic secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 30(5):490-494.
- Choleris E, Gustafsson JA, Korach KS, Muglia LJ, Pfaff DW, Ogawa S. 2003. An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor-alpha and -beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(10):6192-6197.
- Chronwall BM. 1985. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides* 6 Suppl 2:1-11.
- Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, Woods SC, Mangiaracina M, Geary N. 2007. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes* 56(4):1051-1058. Erratum in: 56(10):2649.
- Coll AP. 2007. Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential? *Clin Sci (Lond)* 113(4):171-182.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord Suppl* 5:S63-67.
- Cortez-Pinto H, Gouveia M, dos Santos Pinheiro L, Costa J, Borges M, Vaz Carneiro A. 2010. The burden of disease and the cost of illness attributable to alcohol drinking – results of a national study. *Alcohol Clin Exp Res* 34(8):1442-1449.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
- Coyoy A, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. 2016. Metabolism Regulation by Estrogens and Their Receptors in the Central Nervous System Before and After Menopause. *Horm Metab Res* [Epub ahead of print].

- Criscione L, Rigollier P, Batzl-Hartmann C, Rüeger H, Stricker-Krongrad A, Wyss P, Brunner L, Whitebread S, Yamaguchi Y, Gerald C, Heurich RO, Walker MW, Chiesi M, Schilling W, Hofbauer KG, Levens N. 1998. Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. *J Clin Invest* 102(12):2136-2145.
- Crowley WR, Tessel RE, O'Donohue TL, Adler BA, Kalra SP. 1985. Effects of ovarian hormones on the concentrations of immunoreactive neuropeptide Y in discrete brain regions of the female rat: correlation with serum luteinizing hormone (LH) and median eminence LH-releasing hormone. *Endocrinol* 117(3):1151-1155.
- Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. 2014. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol* 52(3):R223-240.
- Cushing BS, Wynne-Edwards KE. 2006. Estrogen receptor-alpha distribution in male rodents is associated with social organization. *J Comp Neurol* 494(4):595-605.
- Cyr NE, Toorie AM, Steger JS, Sochat MM, Hyner S, Perello M, Stuart R, Nillni EA. 2013. Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic  $\alpha$ -MSH and TRH. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* 304:E640-E650.
- De Witte P. 2004. Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol. *Addict Behav* 29(7):1325-1339.
- DeMaria JE, Livingstone JD, Freeman ME. 2000. Ovarian steroids influence the activity of neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res* 879(1-2):139-147.
- de Souza FS, Nasif S, López-Leal R, Levi DH, Low MJ, Rubinsten M. 2011. The estrogen receptor  $\alpha$  colocalizes with proopiomelanocortin in hypothalamic neurons and binds to a conserved motif present in the neuron-specific enhancer nPE2. *Eur J Pharmacol* 660:181-187.

- Diano S, Kalra SP, Sakamoto H, Horvath TL. 1998. Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res* 812(1-2):256-259.
- Dohler KD, Srivastava SS, Shryne JE, Jarzab B, Sipos A, Gorski RA. 1984. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinol* 38(4):297-301.
- Dores RM, Jain M, Akil H. 1986. Characterization of the forms of beta-endorphin and alpha-MSH in the caudal medulla of the rat and guinea pig. *Brain Res* 377(2):251-260.
- Drewett RF. 1973. Oestrous and dioestrous components of the ovarian inhibition on hunger in the rat. *Anim Behav* 21(4):772-780.
- Druce MR, Small CJ, Bloom SR. 2004. Minireview: Gut peptides regulating satiety. *Endocrinol* 145(6):2660-2665.
- Dye L, Blundell JE. 1997. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. *Hum Reprod* 12:1142-1151.
- Dzenda T, Ayo JO, Lakpini CA, Adelaiye AB. 2013. Seasonal, sex and live weight variations in feed and water consumptions of adult captive African Giant rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse-1840) kept individually in cages. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 97:465-474.
- Eckel LA. 2004. Estradiol: a rhythmic, inhibitory, indirect control of meal size. *Physiol Behav* 82(1):35-41.
- Eckel LA. 2011. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol Behav* 104:517-524.
- Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. 1999. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 160(3):R7-12.



- Egli M. 2003. Peptides: their role in excess alcohol drinking and their promise as a therapeutic tool. *Physiol Behav* 79:89-93.
- Ehlers CL, Li TK, Lumeng L, Hwang BH, Somes C, Jimenez P, Mathé AA. 1998. Neuropeptide Y levels in ethanol-naive alcohol-preferring and nonpreferring rats and in Wistar rats after ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 22(8):1778-1782.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. 1998. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402(4):442-459.
- Elmquist JK, Bjørbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395(4):535-547.
- Emanuele NV, LaPaglia N, Steiner J, Kirsteins L, Emanuele MA. 2001. Effect of chronic ethanol exposure on female rat reproductive cyclicity and hormone secretion. *Alcohol Clin Exp Res* 25(7):1025-1029.
- Feijóo-Bandín S, Portolés M, Roselló-Lletí E, Rivera M, González-Juanatey JR, Lago F. 2015. 20 years of leptin: Role of leptin in cardiomyocyte physiology and physiopathology. *Life Sci* 140:10-8.
- Firozan B, Goudarzi I, Elahdadi Salmani M, Lashkarbolouki T, Rezaei A, Abrari K. 2014. Estradiol increases expression of the brain-derived neurotrophic factor after acute administration of ethanol in the neonatal rat cerebellum. *Eur J Pharmacol* 732:1-11.
- Forslin Aronsson A, Spulber S, Oprica M, Winblad B, Post C, Schultzberg M. 2007. Alpha-MSH rescues neurons from excitotoxic cell death. *J Mol Neurosci* 33(3):239-251.
- Forslin Aronsson S, Spulber S, Popescu LM, Winblad B, Post C, Oprica M, Schultzberg M. 2006. Alpha-Melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global cerebral ischemia. *Neuropeptides* 40(1):65-75.

- Fulton S. 2010. Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol* 31(1):85-103
- Gamber KM, Huo L, Ha S, Hairston JE, Greeley S, Bjorbaek C. 2012. Over-expression of leptin receptors in hypothalamic POMC neurons increase susceptibility to diet-induced obesity. *PLoS One* 7:1-14.
- Gangisetty O, Wynne O, Jabbar S, Nasello C, Sarkar DK. 2015. Fetal Alcohol Exposure Reduces Dopamine Receptor D2 and Increases Pituitary Weight and Prolactin Production via Epigenetic Mechanisms. *PLoS One* 10(10):e0140699.
- Garfield AS, Lam DD, Marston OJ, Przydzial MJ, Heisler LK. 2009. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 20(5):203-215.
- Geary N, Asarian L, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S. 2001. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinol* 142:4751-4757.
- Gosmanov NR, Gosmanov AR, Gerich JE. Glucagon Physiology. 2011. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText. com, Inc.; 2000. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279127/>
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. 1998. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96(10):857-881.
- Gundersen HJ, Jensen EB. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147(Pt 3):229-263.

- Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J. 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. *J Microsc* 193:199-211.
- Hallschmid M, Benedict C, Born J, Fehm HL, Kern W. 2004. Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man. *Physiol Behav* 83(1):55-64.
- Harper C. 2009. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol* 44:136-140.
- Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC. 2012. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacol* 63(1):3-17.
- Heilig M, Widerlov E. 1995. Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y. *Crit Rev Neurobiol* 9(2-3):115-136.
- Hermano BM. 2013. Bebendo entre amigos: um estudo antropológico sobre uso de bebidas alcoólicas na Casa de Apoio à Saúde Indígena de Roraima. Dissertação (mestrado) Universidades Federais de Pernambuco e de Roraima.
- Higuchi H. 2012. Molecular analysis of central feeding regulation by neuropeptide Y (NPY) neurons with NPY receptor small interfering RNAs (siRNAs). *Neurochem Int* 61(6):936-941.
- Higuchi H, Hasegawa A, Yamaguchi T. 2005. Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: transcriptional regulation of neuropeptide Y gene by leptin and its effect on feeding. *J Pharmacol Sci* 98(3):225-231.
- Higuchi H, Niki T, Shiiya T. 2008. Feeding behavior and gene expression of appetite-related neuropeptides in mice lacking for neuropeptide Y Y5 receptor subclass. *World J Gastroenterol* 14(41):6312-6317.

- Hirosawa M, Minata M, Harada KH, Hitomi T, Krust A, Koizumi A. 2008. Ablation of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) prevents upregulation of POMC by leptin and insulin. *Bioch Biophys Res Commun* 371:320-323.
- Hornykiewicz O. 1996. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev* 18(2):925-964.
- Hou Y, Yang SP, Voogt JL. 2003. Changes in estrogen receptor-alpha expression in hypothalamic dopaminergic neurons during proestrous prolactin surge. *Endocrine* 20(1-2):131-138.
- Ignacio DL, Frankenfeld TG, Fortunato RS, Vaisman M, Werneck-de-Castro JP, Carvalho DP. 2009. Body mass regulation by estrogen and physical activity. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(3):310-317.
- Jen M, Yan AC. 2010. Syndromes associated with nutritional deficiency and excess. *Clin Dermatol*. 28(6):669-685.
- Kachani AT, Brasiliano S, Hochgraf PF. 2008. O impacto do consume alcoólico no ganho de peso. *Revista de Psiquiatria Clinica* 35(1):21-24.
- Kanatani A, Mashiko S, Murai N, Sugimoto N, Ito J, Fukuroda T, Fukami T, Morin N, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Saga Y, Nishimura S, Ihara M. 2000. Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinol* 141(3):1011-1016.
- Kercmar J, Tobet SA, Majdic G. 2014. Social isolation during puberty affects female sexual behavior in mice. *Front Behav Neurosci* 8:337.
- Khaksari M, Hajializadeh Z, Shahrokhi N, Esmaeili-Mahani S. 2015. Changes in the gene expression of estrogen receptors involved in the protective effect of estrogen in rat's traumatic brain injury. *Brain Res* 1618:1-8.

- Kiefer F, Jahn H, Kellner M, Naber D, Wiedemann K. 2001. Leptin as a possible modulator of craving for alcohol. *Arch Gen Psychiatry* 58(5):509-10. Erratum in: 59(1):61.
- Kim HJ, Lee JH, Choi SH, Lee YS, Jahng JW. 2005. Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* 39(6):587-594.
- Kim KS, Yoon YR, Lee HJ, Yoon S, Kim SY, Shin SW, An JJ, Kim MS, Choi SY, Sun W, Baik JH. 2010. Enhanced hypothalamic leptin signaling in mice lacking dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 285(12):8905-8917.
- Kim MO, Lee YK, Choi WS, Kim JH, Hwang SK, Lee BJ, Kang SG, Kim K, Baik SH. 1997. Prolonged ethanol intake increases D2 dopamine receptor expression in the rat brain. *Mol Cells* 7(5):682-687.
- Kimball C, Murlin J. 1923. Aqueous extracts of pancreas III. Some precipitation reactions of insulin. *J Biochemistry* 58:337-348.
- Kinoshita H, Jessop DS, Finn DP, Coventry TL, Roberts DJ, Ameno K, Ijiri I, Harbuz MS. 2000. Acute ethanol decreases NPY mRNA but not POMC mRNA in the arcuate nucleus. *Neuroreport* 11(16):3517-3519.
- Kirchgessner AL. 2002. Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev* 23(1):1-15.
- Koike S, Sakai M, Muramatsu M. 1987. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 15(6):2499-2513.
- Kojima K, Amiya N, Kamijo M, Kageyama H, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K. 2010. Relationship between alpha-melanocyte-stimulating hormone- and neuropeptide Y-containing neurons in the goldfish hypothalamus. *Gen Comp Endocrinol* 167:366-372.
- Kokare DM, Singru PS, Dandekar MP, Chopde CT, Subhedar NK. 2008. Involvement of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) in differential ethanol exposure

and withdrawal related depression in rat: neuroanatomical-behavioral correlates. *Brain Res* 1216:53-67.

- Konturek PC, Konturek JW, Cześnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek SJ. 2005. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 6:5-25.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. 2004. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 55(1 Pt 2):137-154.
- Kralova Lesna I, Kralova A, Cejkova S, Fronek J, Petras M, Sekerkova A, Thieme F, Janousek L, Poledne R. 2016. Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue. *J Transl Med* 14(1):208.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12):5925-5930.
- Larco DO, Cruthirds DF, Weiser MJ, Handa RJ, Wu TJ. 2012. The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. *Endocrine* 42(3):717-725.
- Lauber AH, Mobbs CV, Muramatsu M, Pfaff DW. 1991. Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinol* 129(6):3180-3186.
- Leal S, Andrade JP, Paula-Barbosa MM, Madeira MD. 1998. Arcuate nucleus of the hypothalamus: effects of age and sex. *J Comp Neurology* 401: 65-88.
- Leibowitz SF, Akabayashi A, Alexander JT, Wang J. 1998. Gonadal steroids and hypothalamic galanin and neuropeptide Y: role in eating behavior and body weight control in female rats. *Endocrinol* 139, 1771-1780.

- Leite CM, Szawka RE, Anselmo-Franci JA. 2008. Alpha-oestrogen and progesterone receptor expression in the hypothalamus and preoptic area dopaminergic neurones during oestrous in cycling rats. *J Neuroendocrinol* 20(1):110-119.
- Li N, Shi X, Fu S, Zhu F, Yang S. 2011. Chronic alcohol administration increases serum prolactin level and pituitary cell proliferation, and alters hypothalamus neurotransmitters in rat. *Neuro Endocrinol Lett* 32(2):170-175.
- Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, Friedman JM, Elmquist JK. 2003. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* 23(18):7143-7154.
- Lloyd K, Dayan P. 2016. Safety out of control: dopamine and defence. *Behav Brain Funct* 12(1):15.
- Lovinger DM. 1993. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol Clin Exp Res* 17(1):19-27.
- Machado, ABM, Haertel, LM. 2014. *Neuroanatomia Funcional*. 3º ed. Editora Atheneu, São Paulo
- Madeira MD, Andrade JP, Lieberman AR, Sousa N, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. 1997. Chronic alcohol consumption and withdrawal do not induce cell death in the suprachiasmatic nucleus, but lead to irreversible depression of peptide immunoreactivity and mRNA levels. *J Neurosci* 17(4):1302-1319.
- Madeira MD, Paula-Barbosa MM. 1999. Effects of alcohol on the synthesis and expression of hypothalamic peptides. *Brain Res Bull* 48:3-22.
- Madeira MD, Sousa N, Lieberman AR, Paula-Barbosa MM. 1993. Effects of chronic alcohol consumption and of dehydration on the supraoptic nucleus of adult male and female rats. *Neurosci* 56:657-672.

- Maior AS. 2012. Hormonal regulation of food intake: a brief review. *Medicina (Ribeirão Preto)* 45(3):303-309.
- Malva JO, Xapelli S, Baptista S, Valero J, Agasse F, Ferreira R, Silva AP. 2012. Multifaces of neuropeptide Y in the brain – neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. *Neuropeptides* 46(6):299-308.
- Manuel-Apolinar L, Rocha L, Damasio L, Tesoro-Cruz E, Zarate A. 2014. Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: implications of food intake. *Mol Med Rep* 9(2):407-412.
- Maolood N, Meister B. 2010. Nociceptin/orphanin FQ peptide in hypothalamic neurons associated with the control of feeding behaviour. *J Neuroendocrinol* 22:75-82.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62(4A):609-614.
- Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD. 1999. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 21(1):119-122.
- McEwen BS, Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20(3):279-307.
- McEwen BS, Gray JD, Nasca C. 2015. 60 Years of neuroendocrinology: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. *J Endocrinol* 226(2):T67-83.
- Mechoulam R, Brueggemeier RW, Denlinger DL. 1984. Estrogens in insects. *Cellular and Molecular Life Sci* 40(9):942-944.
- Medina F, Siddiqui A, Scimonelli T, Fenske C, Wilson CA, Celis ME. 1998. The inter-relationship between gonadal steroids and POMC peptides, beta-endorphin and alpha-MSH, in the control of sexual behavior in the female rat. *Peptides* 19(8):1309-16.



- Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, Rossi-Fanelli F. 2000. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* 16(10):843-857.
- Meiser J, Weindl D, Hiller K. 2013. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* 11(1):34.
- Meister B. 2007. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 92(1-2):263-271.
- Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T. 1998. XVI International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev* 50(1):143-150.
- Minor RK, Chang JW, de Cabo R. 2009. Hungry for life: How the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. *Mol Cell Endocrinol* 299(1):79-88.
- Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE. 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinol* 144(5):2055-67. Erratum in: 144(7):2844.
- MohanKumar SM, Kasturi BS, Shin AC, Balasubramanian P, Gilbreath ET, Subramanian M, Mohankumar PS. 2011. Chronic estradiol exposure induces oxidative stress in the hypothalamus to decrease hypothalamic dopamine and cause hyperprolactinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(3):R693-699.
- Morel GR, Carón RW, Console GM, Soaje M, Sosa YE, Rodríguez SS, Jahn GA, Goya RG. 2009. Estrogen inhibits tuberoinfundibular dopaminergic neurons but does not cause irreversible damage. *Brain Res Bull* 80(6):347-352.

- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.
- Mosquera L, Colón JM, Santiago JM, Torrado AI, Meléndez M, Segarra AC, Rodríguez-Orengo JF, Miranda JD. 2014. Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha. *Brain Res* 1561:11-22.
- Mukherjee S. 2013. Alcoholism and its effects on the central nervous system. *Curr Neurovasc Res* 10:256-262.
- Munzberg H, Huo L, Nilni EA, Hollenberg AN, Bjørbaek C. 2003. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinol* 144:2121-2131.
- Navarro M, Cubero I, Knapp DJ, Breese GR, Thiele TE. 2008. Decreased immunoreactivity of the melanocortin neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) after chronic ethanol exposure in Sprague-Dawley rats. *Alcohol Clin Exp Res* 32(2):266-276.
- Navarro M, Cubero I, Thiele TE. 2013. Decreased immunoreactivity of the polypeptide precursor pro-opiomelanocortin (POMC) and the prohormone convertase pc1/3 after chronic ethanol exposure in Sprague-Dawley rats. *Alcohol Clin Exp Res* 37(3):399-406.
- Nóbrega MPSS, Oliveira, EM. 2005. Mulheres usuárias de álcool: análise qualitativa. *Revista de Saúde Pública* 39(5):816-823.
- Oga S. 1996. Fundamentos de toxicologia. Editora Atheneu, São Paulo.
- Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. 1998. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinol* 139(12):5070-5081.

- Olney JJ, Navarro M, Thiele TE. 2014b. Targeting central melanocortin receptors: a promising novel approach for treating alcohol abuse disorders. *Front Neurosci* 8:128.
- Olney JJ, Sprow GM, Navarro M, Thiele TE. 2014a. The protective effects of the melanocortin receptor (MCR) agonist, melanotan-II (MTII), against binge-like ethanol drinking are facilitated by deletion of the MC3 receptor in mice. *Neuropeptides* 48(1):47-51.
- Oomizu S, Boyadjieva N, Sarkar DK. 2003. Ethanol and estradiol modulate alternative splicing of dopamine D2 receptor messenger RNA and abolish the inhibitory action of bromocriptine on prolactin release from the pituitary gland. *Alcohol Clin Exp Res* 27(6):975-980.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Relatório Global sobre Álcool e Saúde. 2014. Genebra, Suíça.
- Palmiter RD. 2007. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci* 30(8):375-381.
- Pan Y, Xu L, Wang Z, Zhang Z. 2011. Expression of oestrogen receptor  $\alpha$  in the brain of Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*): sex differences and variations during ovarian cycles. *J Neuroendocrinol* 23(10):926-932.
- Patterson-Buckendahl P, Kubovcakova L, Krizanova O, Pohorecky LA, Kvetnansky R. 2005. Ethanol consumption increases rat stress hormones and adrenomedullary gene expression. *Alcohol* 37(3):157-166.
- Paula-Barbosa MM, Brandão F, Madeira MD, Cadete-Leite A. 1993. Structural changes in the hippocampal formation after long-term alcohol consumption and withdrawal in the rat. *Addiction* 88(2):237-247.

- Pereira PA, Neves J, Vilela M, Sousa S, Cruz C, Madeira M.D. 2014. Chronic alcohol consumption leads to neurochemical changes in the nucleus accumbens that are not fully reversed by withdrawal. *Neurotoxicol Teratol* 44:53-61.
- Pereira PA, Rocha JP, Cardoso A, Vilela M, Sousa S, Madeira MD. 2016. Effects of chronic alcohol consumption, withdrawal and nerve growth factor on neuropeptide Y expression and cholinergic innervation of the rat dentate hilus. *Neurotoxicol* 54:153-160.
- Pfaff DW, Vasudevan N, Kia HK, Zhu YS, Chan J, Garey J, Morgan M, Ogawa S. 2000. Estrogens, brain and behavior: studies in fundamental neurobiology and observations related to women's health. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5):365-373.
- Pinto-Machado J. 1966. On vaginal cytology in teratogenic tests. *Acta Gynaecol Obstet Hisp Lusit* 15(6):325-334.
- Pritchard LE, Turnbull AV, White A. 2002. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol* 172(3):411-421.
- Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, Arterburn JB. 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109(3-5):350-353.
- Ramos EJ, Meguid MM, Campos AC, Coelho JC. 2005. Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. *Nutrition* 21(2):269-279.
- Ribeiro G, Santos O. 2013. Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* 8(2):82-88.

- Riediger T, Traebert M, Schmid HA, Scheel C, Lutz TA, Scharrer E. 2003. Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 341(2):151-155.
- Rissman EF. 2008. Roles of oestrogen receptors alpha and beta in behavioural neuroendocrinology: beyond Yin/Yang. *J Neuroendocrinol* 20(6):873-879.
- Roberts C, Robinson SP. 2007. Alcohol concentration and carbonation of drinks: the effect on blood alcohol levels. *J Forensic Leg Med* 14(7):398-405.
- Roesch DM. 2006. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 87:39-44.
- Romero-Fernandez W, Borroto-Escuela DO, Vargas-Barroso V, Narváez M, Di Palma M, Agnati LF, Larriva Sahd J, Fuxe K. 2014. Dopamine D1 and D2 receptor immunoreactivities in the arcuate-median eminence complex and their link to the tubero-infundibular dopamine neurons. *Eur J Histochem* 58(3):2400.
- Roy A, Pandey SC. 2002. The decreased cellular expression of neuropeptide Y protein in rat brain structures during ethanol withdrawal after chronic ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 26(6):796-803.
- Ruscio MG, Sweeny TD, Gomez A, Parker K, Carter CS. 2009. Social environment alters central distribution of estrogen receptor alpha in juvenile prairie voles. *Physiol Behav* 98(3):296-301.
- Ryan KJ. 1982. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Res* 42(8 Suppl):3342s-3344s.
- Sadagurski M, Dong XC, Myers MG Jr, White MF. 2013. Irs2 and Irs4 synergize in non-LepRb neurons to control energy balance and glucose homeostasis. *Mol Metab* 3(1):55-63.

- Sainsbury A, Zhang L. 2010. Role of the arcuate nucleus of the hypothalamus in regulation of body weight during energy deficit. *Mol Cell Endocrinol* 316(2):109-119.
- Sakurai T. 1999. Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept* 85(1):25-30.
- Sanchis R, Esquifino A, Guerri C. 1985. Chronic ethanol intake modifies estrous cyclicity and alters prolactin and LH levels. *Pharmacol Biochem Behav* 23(2):221-224.
- Sandoval D, Cota D, Seeley RJ. 2008. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu Rev Physiol* 70:513-535.
- Santollo J, Daniels D. 2015. Multiple estrogen receptor subtypes influence ingestive behavior in female rodents. *Physiol Behav* pii:S0031-9384(15)00326-1.
- Santollo J, Eckel LA. 2008. Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. *Behav Brain Res* 191(2):173-177.
- Sar M, Sahu, A, Crowley WR, Kalra SP. 1990. Localization of neuropeptide-Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus. *Endocrinol* 127:2752-2756.
- Sarkar DK. 2010. Hyperprolactinemia following chronic alcohol administration. *Front Horm Res* 38:32-41.
- Sarkola T, Mäkisalo H, Fukunaga T, Eriksson CJ. 1999. Acute effect of alcohol on estradiol, estrone, progesterone, prolactin, cortisol, and luteinizing hormone in premenopausal women. *Alcohol Clin Exp Res* 23(6):976-982.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Hayase M, Tsuji T, Imagawa K, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K. 1997. The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett* 224(3):149-152.

- Schwartz GJ, Whitney A, Skoglund C, Castonguay TW, Moran TH. 1999. Decreased responsiveness to dietary fat in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *Am J Physiol* 277(4 Pt 2):R1144-1151.
- Shelkar GP, Kale AD, Singh U, Singru PS, Subhedar NK, Kokare DM. 2015. Alpha-melanocyte stimulating hormone modulates ethanol self-administration in posterior ventral tegmental area through melanocortin-4 receptors. *Addict Biol* 20(2):302-315.
- Shi H, Seeley RJ, Clegg DJ. 2009. Sexual difference in the control of the energy homeostasis. *Front. Neuroendocrinol* 30:396-404.
- Shi H, Sorrell JE, Clegg DJ, Woods SC, Seeley RJ. 2010. The roles of leptin receptors on POMC neurons in the regulation of sex-specific energy homeostasis. *Physiol. Behav* 100:165-172.
- Shimizu H, Inoue K, Mori M. 2007. The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *J Endocrinol* 193(1):1-9.
- Shimizu H, Ohtani K, Kato Y, Tanaka Y, Mori M. 1996. Withdrawal of estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neurosci Lett* 204:81-84. Erratum in: 227:143.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388(4):507-525.
- Siawrys G, Kaminski T, Smolinska N, Przala J. 2009. Expression of leptin and long-form leptin-receptor proteins in porcine hypothalamus during oestrous cycle and pregnancy. *Reprod Domest Anim* 44:920-926.

- Silva LE, Castro M, Amaral FC, Antunes-Rodrigues J, Elias LL. 2010. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Braz J Med Biol Res* 43:759-766.
- Silva SM, Madeira MD. 2012. Effects of chronic alcohol consumption and withdrawal on the response of the male and female hypothalamic-pituitary-adrenal axis to acute immune stress. *Brain Res* 1444:27-37.
- Silva SM, Madeira MD, Ruela C, Paula-Barbosa MM. 2002a. Prolonged alcohol intake leads to irreversible loss of vasopressin and oxytocin neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 925:76-88.
- Silva SM, Paula-Barbosa MM, Madeira MD. 2002b. Prolonged alcohol intake leads to reversible depression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus. *Brain Res* 954:82-93.
- Silva SM, Santos-Marques MJ, Madeira MD. 2009. Sexually dimorphic response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to chronic alcohol consumption and withdrawal. *Brain Res* 1303:61-73.
- Simerly RB. 1995. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In "The Rat Nervous System". (G. Paxinos Ed.), pp. 353-376. Academic Press, New York.
- Simerly RB, Carr AM, Zee MC, Lorang D. 1996. Ovarian steroid regulation of estrogen and progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *J Neuroendocrinol* 8(1):45-56.
- Sliwinska-Mosson M, Borowiecka K, Milnerowicz H. 2013. Neuropeptides Y, YY, PP and their clinical significance. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 67:631-636.
- Sohrabji F. 2002. Neurodegeneration in women. *Alcohol Res Health* 26:316–318.



- Stanley BG, Leibowitz SF. 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(11):3940-3943.
- Sullivan EV, Fama R, Rosenbloom MJ, Pfefferbaum A. 2002. A profile of neuropsychological deficits in alcoholic women. *Neuropsychol* 16:74-83.
- Suter PM. 2005. Is alcohol consumption a risk factor for weight gain and obesity? *Crit Rev Clin Lab Sci* 42(3):197-227.
- Tavares MA, Paula-Barbosa MM. 1984. Remodeling of the cerebellar glomeruli after long-term alcohol consumption in the adult rat. *Brain Res* 309:217-226.
- Tatemoto K. 1982. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(18):5485-5489.
- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. 1982. Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296(5858):659-660.
- Thiele TE, Badia-Elder NE. 2003. A role for neuropeptide Y in alcohol intake control: evidence from human and animal research. *Physiol Behav* 79(1):95-101.
- Thiele TE, Navarro M, Sparta DR, Fee JR, Knapp DJ, Cubero I. 2003. Alcoholism and obesity: overlapping neuropeptide pathways? *Neuropeptides* 37:321-337.
- Thiele TE, Naveilhan P, Ernfors P. 2004a. Assessment of ethanol consumption and water drinking by NPY Y(2) receptor knockout mice. *Peptides* 25(6):975-983.
- Thiele TE, Sparta DR, Hayes DM, Fee JR. 2004b. A role for neuropeptide Y in neurobiological responses to ethanol and drugs of abuse. *Neuropeptides* 38(4):235-243.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:158-68.

- van den Pol, Cassidy JR. 1982. The hypothalamic arcuate nucleus of rat – a quantitative Golgi analysis. *J Comp Neurol* 204(1):65-98.
- Varma M, Chai JK, Meguid MM, Laviano A, Gleason JR, Yang ZJ, Blaha V. 1999. Effect of estradiol and progesterone on daily rhythm in food intake and feeding patterns in Fischer rats. *Physiol Behav* 68(1-2):99-107.
- Vasudevan N, Pfaff DW. 2007. Membrane-initiated actions of estrogens I neuroendocrinology: emerging principles. *Endocr Rev* 28(1):1-19.
- Vianna CR, Coppari R. 2011. A treasure trove of hypothalamic neurocircuitries governing body weight homeostasis. *Endocrinology* 152(1):11-18.
- Vieira, JMF. 2012. Metabolismo do Etanol. Tese apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
- Volkow ND, Wang GJ, Baler RD. 2011a. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci* 15(1):37-46.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. 2011b. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(37):15037-15042.
- Wang JH, Wang F, Yang MJ, Yu DF, Wu WN, Liu J, Ma LQ, Cai F, Chen JG. 2008. Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways. *Neurosci* 156(1):89-98.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482-497.
- Wiren KM. 2013. Males and females are just different: sexually dimorphic responses to chronic ethanol exposure in hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett* 550:1-5.

- Wurst FM, Bechtel G, Forster S, Wolfersdorf M, Huber P, Scholer A, Pridzun L, Alt A, Seidl S, Dierkes J, Dammann G. 2003. Leptin levels of alcohol abstainers and detoxification patients are not different. *Alcohol* 38(4):364-368.
- Yamada S, Noguchi D, Ito H, Yamanouchi K. 2009. Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor  $\alpha$ -immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain. *Neurosci Lett* 463:135-139.
- Yoo SB, Ryu V, Park EY, Kim BT, Kang DW, Lee JH, Jahng JW. 2011. The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* 45(5):343-349.
- Yoon YS, Lee JS, Lee HS. 2013. Retrograde study of CART- or NPY-neuronal projection from the hypothalamic arcuate nucleus to the dorsal raphe and/or the locus coeruleus in the rat. *Brain Res* 1519:40-52.
- Yu Z, Geary N, Corwin RL. 2011. Individual effects of estradiol and progesterone on food intake and body weight in ovariectomized binge rats. *Physiol Behav* 104:687-693.
- Zhang F, Zhao W, Li W, Dong C, Zhang X, Wu J, Li N, Liang C. 2013. Neuropeptide Y gene transfection inhibits post-epileptic hippocampal synaptic reconstruction. *Neural Regen Res* 8(17):1597-1605.
- Zhang L, Meguid MM, Miyata G, Varma M, Fetisov SO. 2001. Role of hypothalamic monoamines in nicotine-induced anorexia in menopausal rats. *Surgery* 130(2):133-142.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505):425-432. Erratum in: 374(6521):479.